

ESTANDARIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE PCR PARA LA AMPLIFICACIÓN
DE CITOCROMO OXIDASA C, SUBUNIDAD I (COI) Y EVALUACIÓN DE SU
CONTENIDO INFORMATIVO EN DOS POBLACIONES DE *Urotrygon aspidura* DEL
PACÍFICO VALLECAUCANO

ANA MARÍA QUIÑONEZ SANCHEZ



UNIVERSIDAD DEL VALLE

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS

PROGRAMA ACADÉMICO DE BIOLOGÍA

SANTIAGO DE CALI

2011

ESTANDARIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE PCR PARA LA AMPLIFICACIÓN
DE CITOCROMO OXIDASA C, SUBUNIDAD I (COI) Y EVALUACIÓN DE SU
CONTENIDO INFORMATIVO EN DOS POBLACIONES DE *Urotrygon aspidura* DEL
PACÍFICO VALLECAUCANO

ANA MARÍA QUIÑONEZ SANCHEZ

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Biólogo

DIRECTOR

Heiber Cárdenas Henao. Biólogo M. Sc.

CODIRECTOR

José Sergio Hleap Lozano. Biólogo, M. Sc

UNIVERSIDAD DEL VALLE

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS

PROGRAMA ACADÉMICO DE BIOLOGÍA

SANTIAGO DE CALI

2011

PROGRAMA ACADÉMICO DE BIOLOGÍA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
UNIVERSIDAD DEL VALLE

ANA MARIA QUIÑONEZ SANCHEZ, 1988

TÍTULO “ESTANDARIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE PCR PARA LA
AMPLIFICACIÓN DE CITOCROMO OXIDASA SUBUNIDAD I (COI) Y
EVALUACIÓN DE SU CONTENIDO INFORMATIVO EN DOS POBLACIONES DE
Urotrygon aspidura DEL PACÍFICO VALLECAUCANO”

TEMAS. Elasmobranquios, condiciones de PCR, Citocromo C Oxidasa I, genética de
poblaciones.

Nota de Aprobación

El trabajo de grado titulado “Estandarización de las condiciones de PCR para la amplificación de citocromo oxidasa C, subunidad I (COI) y evaluación de su contenido informativo en dos poblaciones de *Urotrygon aspidura* del Pacífico vallecaucano” presentado por la estudiante ANA MARÍA QUIÑONEZ SANCHEZ, para optar al título de bióloga, fue revisado por el jurado y calificado como:

Aprobado

Heiber Cárdenas Henao

Director

José Sergio Hleap Lozano

Codirector

Jurado

DEDICATORIA

A la mujer que más admiro por su incansable tenacidad, por su infinita sabiduría, admirable inteligencia e inagotable amor y cuidados, a mí mejor amiga: mi mamá.

A Marlene por su incondicional apoyo, por su amor, por ser mí amiga, por ser tan sabia, por regalarme tanta felicidad, por creer en mí.

A Ángela por su compañía y cariño.

A Birger por su paciencia, comprensión, amor y por ser mi nuevo sol.

A Dios por guiarme y traerme hasta donde estoy.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a todos aquellos que hicieron que este proyecto fuera posible; a todas a aquellas personas que pasaron por mi vida y dejaron una enseñanza, gracias por ayudarme a aprender y a mejorar cada día.

Agradezco infinitamente a Sergio Hleap por haberme enseñado tantas cosas maravillosas, por haberme dado la oportunidad de aprender y crecer junto a él, por haber compartido su sabiduría conmigo; por ser mi codirector y amigo durante este periodo, por sus consejos, regaños y la confianza que deposito en mi.

A Heiber Cárdenas, por haber dirigido esta investigación, por su paciencia y su invaluable compañía, confianza, consejos y amistad durante el tiempo de investigación. Por ser mi maestro en esta etapa.

A Ángela María Mendoza, por su paciencia, desinteresada ayuda y compañía.

A Diego Mauricio Solarte, Ronny Orobio y Fernando Díaz por ser mis consejeros, amigos, compañeros y tenderme la mano durante todo mi proceso en el laboratorio.

A la vicerrectoria de investigaciones de la Universidad del Valle, quien financió este proyecto.

A la fundación SQUALUS por su valiosa información y ayuda en la obtención de las muestras empleadas en este proyecto.

A mi tía Marlene por su invaluable apoyo y su infinito amor durante toda mi carrera.

A mi mama por ser mi ángel de la guarda, por sus sabios consejos, su paciencia, su inagotable amor, su incansable esfuerzo, por compartir tanta sabiduría conmigo, por ser mi mejor amiga, por su tenacidad, compañía y ejemplo.

A mi hermana Ángela y a Fredy por su cariño, comprensión, compañía y apoyo durante todo este proceso.

A Birger por su paciencia y comprensión, por haberme visto crecer durante esta etapa, por apoyar y animar mi esfuerzo, por su amor y su compañía.

Y finalmente a Dios por haberme puesto en el maravilloso mundo de la ciencia y la investigación, por ser mi guía y haber puesto en mi camino tantas personas maravillosas dispuestas a ayudarme, por abrirme tantas puertas y mostrarme tantas oportunidades y bendiciones

TABLA DE CONTENIDO

| | Página |
|--|---------------|
| 1. RESUMEN | 1 |
| 2. INTRODUCCIÓN | 2 |
| 3. MARCO TEÓRICO | 7 |
| 3.1 Utilidad de las herramientas genética en elasmobranquios | 9 |
| 3.2 Utilidad del contenido informativo del gen citocromo oxidasa C subunidad I en Elasmobranquios | 13 |
| 4.OBJETIVOS | 15 |
| 4.1 Objetivo general | 15 |
| 4.2 objetivos específicos | 15 |
| 5.MATERIALES Y METODOS | 16 |
| 5.1 Obtención de muestras | 16 |
| 5.2 Extracción de ADN | 17 |
| 5.3 Estandarización de las condiciones de PCR para la amplificación de COI | 18 |
| 5.4 Análisis del contenido informativo de COI | 20 |
| 6.RESULTADOS | 22 |
| 6.1 Validación de la técnica de extracción de ADN | 22 |
| 6.2 Estandarización de las condiciones de PCR para la amplificación de COI | 23 |

| | |
|---|-----------|
| 6.3 Análisis del contenido informativo de COI | 26 |
| 6.3.1 Análisis del contenido informativo polimórfico | 26 |
| 6.3.2 Análisis del contenido informativo a nivel interpoblacional | 28 |
| 7. DISCUSION | 32 |
| 8. CONCLUSIONES | 39 |
| 8. LITERATURA CITADA | 40 |

LISTA DE FIGURAS

| | página |
|---|---------------|
| FIGURA 1. Mapa de sitios de recolección de muestras en el pacifico vallecaucano | 16 |
| FIGURA 2. Foto de gel de agarosa de amplificación de un fragmento de citocromo oxidasa subunidad I , empleando 2,5mM de cloruro de magnesio (MgCl ₂), 48°C de temperatura de hibridación, y 2 ul de ADN sin diluir. | 24 |
| FIGURA 3. Foto de gel de agarosa de amplificación de un fragmento de citocromo oxidasa subunidad I , empleando 2,0mM de cloruro de magnesio (MgCl ₂), 48°C de temperatura de hibridación, y 2 ul de ADN puro sin diluir | 24 |
| FIGURA 4. Foto de gel de agarosa de amplificación de un fragmento de citocromo oxidasa subunidad I , empleando 2,5mM de cloruro de magnesio (MgCl ₂), 50°C de temperatura de hibridación, y 2 ul de ADN puro sin diluir. | 25 |
| FIGURA 5. Foto de gel de agarosa de amplificación de un fragmento de citocromo oxidasa subunidad I , empleando 2,0mM de cloruro de magnesio (MgCl ₂), 50°C de temperatura de aneling, y 2 ul de ADN puro sin diluir. | 26 |

LISTA DE TABLAS

| | página |
|--|---------------|
| TABLA 1. Cebadores empleados en la amplificación de citocromo oxidasa C subunidad I (COI) | 18 |
| TABLA 2. Cantidades de ADN y la relación proteínas/ADN obtenidas tras la extracción de por medio de digestión con proteinasa K y la purificación con fenol-cloroformo. | 23 |
| TABLA 3. Resumen del análisis intraespecífico para <i>Urotrygon aspidura</i> en las dos poblaciones analizadas: Juanchaco y La bocana para el gen COI. | 27 |
| TABLA 4. Diversidad haplotípica y nucleotídica y prueba del modelo neutral de Tajima para las dos poblaciones estudiadas. Se muestra los mismos análisis para la población de Juanchaco excluyendo el individuo problema. | 28 |
| TABLA 5. Frecuencias relativas y absolutas de cada uno de los haplotipos encontrados en las poblaciones de Juanchaco y La bocana excluyendo la muestra problemática de la población de Juanchaco. | 29 |
| TABLA 6. Frecuencias haplotípicas en la población total, excluyendo el individuo problemático de la población de Juanchaco. Se muestra el estadístico PIC para la población total. | 30 |
| TABLA 7. Estadísticos producidos por AMOVA para cada población y el índice FST para cada una de ellas, excluyendo el individuo problemático | 31 |

RESUMEN

A pesar del gran porcentaje que representan los batoideos, en especial algunas familias como Urotrygonidae, en la fauna acompañante durante las faenas de pesca de camarón de aguas someras, pocos estudios de genética poblacional se han realizado en nuestro país en este grupo. Al no tener uso comercial, los individuos capturados son descartados, lo cual sea traducido en el poco interés existente en conocer más acerca de esta familia, generando vacíos informativos a nivel ecológico, poblacional y genético. Esto hace necesario conocer la diversidad de esta familia con el ánimo de caracterizar las poblaciones naturales. Tanto en batoideos como en tiburones se ha empleado el gen citocromo oxidasa C subunidad I con propósitos poblacionales, por su alto contenido informativo y ciertas características (alta tasa de evolución molecular, tasa de sustitución nucleotídica superior con respecto a otros genes mitocondriales y poseer regiones conservadas que permiten el diseño de cebadores universales) que lo hacen útil en los estudios donde se busca discriminar especies y estimar la diversidad genética dentro de poblaciones de unidades biológicas poco estudiadas como Urotrygonidae. A partir de este trabajo se estandarizaron las condiciones para la amplificación por medio de PCR de un fragmento de este gen mitocondrial y se estimó el contenido informativo para dos poblaciones del Pacífico vallecaucano de *Urotrygon aspidura* (La bocana y Juanchaco). De acuerdo al análisis de 19 secuencias se hallaron 10 haplotipos no compartidos, se estimó la diversidad haplotípica y nucleotídica, encontrando que la población de La bocana posee menor diversidad que la de Juanchaco. De igual manera, el gen COI posee un alto contenido informativo, resultado útil para la discriminación de poblaciones en esta especie.

INTRODUCCIÓN

Las técnicas moleculares y en especial los marcadores mitocondriales, son herramientas que asociadas a los estudios de la filogenia, Filogeografía y a la genética de poblaciones han logrado esclarecer preguntas relacionadas con los patrones de flujo génico, tiempos de divergencia y relaciones inter e intraespecíficas (Holland & Hadfield 2002, Rubinoff & Sperling 2002).

La utilización de regiones mitocondriales y el análisis de su contenido informativo ha sido empleada en estudios a nivel de especie en diferentes invertebrados como insectos (Smith et al. 1991; Garney et al. 1992; Garney et al. 1995; De la Rúa et al. 1998; Cánovas et al. 2002). gasterópodos, entre otros (Molbo et al. 2003; Ellingson & Krug 2006; Conn & Mirabello 2007; Condon et al. 2008; Salinas, 2010), en análisis evolutivos de algunas especies de vertebrados (Shangang et al. 2006) y en estudios de variación intraespecífica y diversidad genética en mamíferos (Beltrán et al. 1996, Marmi et al. 2007, Ruiz et al. 2007), aves (Grus, et al. 2009), reptiles (Brehm et al. 2002), y anfibios (Vanbradant et al. 2009).

En vertebrados marinos óseos se han utilizado para reconocer el estado poblacional, discriminación filogenética y estudios intraespecíficos en atunes (Ram, et al. 1996, Chow et al. 2000), lenguados (Céspedes et al. 1998, Sotelo et al. 2001) esturiones y salmones (Horstkotte & Rehbein 2003), lisas y róbalos (Peregrino y et al., 2007) entre otros (Martin & Palumbi, 1993, Stepien & Kocher, 1997, Perez et al. 2005).

De igual manera, en otros vertebrados marinos como los elasmobranquios se ha utilizado regiones mitocondriales con fines poblacionales. En tiburones se han usado para establecer la pérdida de diversidad en poblaciones de algunas especies bajo presión antrópica, para establecer estructura genética, diferencias genéticas entre poblaciones de una misma especie en diferentes latitudes, variabilidad intraespecíficas y evaluar la homogeneidad

genética intraespecíficas (Pardini et al. 2001; Grijalva-Chon et al. 2002; Hoelzel et al. 2006; Castro et al. 2007; Lewallen et al. 2007; Ramírez et al. 2007).

Algunos autores como Keeney y colaboradores (2005) han optado por loci microsatelites, para examinar la estructura genética por medio de la comparación y determinación de la diferenciación mitocondrial y nuclear, mientras que Quattro y colaboradores (2006) establecieron separación histórica y potenciales especies crípticas en algunos géneros de tiburones como *Sphyrna* a través de la comparación y análisis entre la variación observada en la región control mitocondrial y el gen mitocondrial citocromo oxidasa C (subunidad I). Este último ha resultado útil en estudios genéticos a nivel poblacional en elasmobranquios por poseer una alta diversidad en la secuencia de aminoácidos codificados por su extremo 5', lo cual resulta muy útil para reubicar especies en categorías taxonómicas superiores y la discriminación de especies estrechamente relacionadas en algunos grupos complejos o "molecularmente problemáticos" de analizar (especies con una baja tasa de evolución molecular y una alta diversidad a nivel de especie) (Hajibabaei et al. 2006).

Adicionalmente, resulta útil para la diferenciación intraespecífica ya que los nucleótidos de la tercera posición, muestran una tasa de sustitución de bases elevada, lo que se traduce en una tasa de evolución molecular mayor y más rápida (Knowlton & Weigt 1998).

Por lo anterior, este gen se ha empleado para estimar la diversidad dentro y entre especies, y diferenciar poblaciones. En algunos taxa se ha encontrado una divergencia intraespecífica oscila entre el 7% y el 14% tanto a nivel intra como interpoblacional (Vences et al. 2005). A nivel interespecífico Herbert y colaboradores (2003) mostraron que las divergencias en este gen era superiores al 2% en el 98% de los especies estudiadas; Ward y colaboradores (2008) discriminaron 210 especies de elasmobranquios empleando

la subunidad I de este gen, encontrando que era útil para diferenciar el 99% de las especies analizadas. En tiburones del género *Squalus*, la divergencia encontrada alcanza el 4% (Ward et al. 2005).

Por esta capacidad para discriminar especies, se ha propuesto la construcción de un “código de barras” donde una secuencia de aproximadamente 500 bp de este gen podría servir como identificador universal de especies. Esta iniciativa facilitaría la tarea de identificación de especies y contribuirá a robustecer las colecciones biológicas, así como a acelerar el inventario de la biodiversidad (Gregory 2005, Hebert & Gregory 2005, Schindel & Miller 2005). Adicionalmente, otro de los aspectos positivos del empleo de un código de barras es que posibilita la asociación de los distintos estados de desarrollo de una misma especie e identificarlas en estados donde las características morfológicas aun no son apreciables, como estados larvales o huevos (Armstrong & Ball, 2005). Dentro de los proyectos que buscan identificar grandes grupos taxonómicos empleando el código de barras, se destacan el FISH-BOL donde 31220 especies de peces ya cuentan con su propio código de barras de las cuales 1114 son elasmobranquios, y el SYTEM BOL, donde ya hay analizadas 268611 incluidos peces y otros taxa. La construcción de este tipo de bases de datos donde se encuentran reportados los diferentes códigos de barras ayudaría a reconocer la diversidad genética existente en los diferentes taxa.

En 2010, se reportaron secuencias de citocromo oxidasa C subunidad I (COI) para el género *Urotrygon* (familia Urotrygonidae), el cual cuenta con grandes vacíos informativos a nivel genético, debido a que representa un gran porcentaje de la fauna acompañante (17% de los elasmobranquios) descartada por no poseer uso comercial, durante las faenas de algunas prácticas pesqueras como la pesca de camarón de aguas someras.

Esto se ha traducido en una limitación en el conocimiento de una parte de su historia natural y filogenia haciendo que los estudios ecológicos, fisiológicos y taxonómicos sean más arduos, por lo que el reporte de secuencias de COI para esta unidad biológica, constituye uno de los primeros pasos para la generación de conocimiento a nivel genético y molecular, y posteriores estudios ecológicos, de historia natural y poblacionales.

Aunque el empleo de COI como código de barras es aceptado en numerosas investigaciones y aunque algunos autores enfatizan que un solo gen, como el citocromo oxidasa C subunidad I, podría ser suficiente para diferenciar una gran mayoría de grupos taxonómicos (Herbert et al. 2003), otros sugieren que es poco probable que el uso de un solo gen, especialmente uno mitocondrial, proporcione datos balanceados, universalmente aceptables o suficientes para el reconocimiento taxonómico de linajes en muchas especies. Es necesario hacer énfasis que los genomas mitocondriales, comparados con los nucleares, tienen formas hereditarias y patrones evolutivos distintos, lo que puede resultar en evaluaciones de biodiversidad muy diferentes (Rubinoff 2006).

Cabe añadir que COI no se comporta igual en todos los taxa, lo cual hace a esta región insuficiente en grupos donde hay variaciones casi nulas en su secuencia haciendo difícil identificar especies, determinar fluctuaciones o grados de diversidad poblacional (Moritz & Cicero 2004, Markman & Tautz 2005, Saunders 2005). Para solucionar este inconveniente se ha propuesto el empleo de otros genes como *rbcL*, *ndhF* o regiones del ADN ribosomal nuclear (ITS) (Chase et al. 2005). Así mismo, algunos autores enfatizan que para que un gen sea útil para propósitos poblacionales este debe mostrar una variación intraespecífica baja mientras que la variación interespecífica debe ser considerable y esto

no ocurre en todos los casos en este gen, como por ejemplo cuando hay eventos de hibridación entre especies (Ward et al. 2005).

A pesar de la controversia alrededor de la utilización de citocromo oxidasa C subunidad I, este gen sigue siendo ampliamente usado por su alta tasa de evolución molecular y su facilidad para ser utilizado en muchos otros grupos taxonómicos por poseer una secuencia conservada de aminoácidos que permite el diseño de cebadores universales (Herbet et al. 2003, Ward 2005).

Siendo citocromo oxidasa C subunidad I una herramienta lo suficientemente informativa para generar aproximaciones a nivel poblacional e intraespecífico en unidades biológicas “problemáticas molecularmente” o con grandes vacíos informativos a nivel genético, este estudio fue una oportunidad para generar información acerca de la estandarización de las condiciones de PCR para la amplificación de citocromo oxidasa subunidad I (COI) en dos poblaciones de la especie *Urotrygon aspidura* proveniente del Pacífico vallecaucano y analizar el contenido informativo de este fragmento mitocondrial en función de la diversidad haplotípica, nucleotídica e interpoblacional, con el objetivo de reconocer características de la población del Pacífico vallecaucano y generar información que permita estudios posteriores a nivel poblacional, ecológico, biológico, evolutivo y filogenético en esta unidad biológica. Así mismo se pretendió determinar qué tan poderoso es citocromo oxidasa C subunidad I para diferenciar poblaciones y como descriptor de la diversidad intraespecífica.

MARCO TEÓRICO

La riqueza de especies cartilaginosos en el mundo oscila entre 929 y 1164 (Compagno 2005). De ese número Colombia posee una alta diversidad y representatividad, encontrándose el 15,3% de las especies identificadas a nivel mundial en nuestro territorio (Mejía-falla et al. 2007), de las cuales casi la mitad de especies de tiburones (48%) y de rayas (46%) no sobrepasa los 100 cm y 50 cm de longitud respectivamente (Hleap et al. 2008).

Muchas de las especies de peces cartilaginosos presentes en aguas colombianas tienen atractivo a nivel comercial, siendo su carne, aleta y cartílago la principal razón por la cual son capturadas. Sin embargo otro gran número hace parte de especies capturadas por pesca incidental, lo cual significa que estas especies no son objetivo de pesca directa sino que hacen parte de la fauna acompañante de las especies de interés durante las actividades de pesca artesanal o industrial.

Dentro de estas actividades de pesquería se destaca la pesca de camarón de aguas someras, desarrollada principalmente en la zona centro sur del Pacífico colombiano (comprendida desde el sur de la desembocadura del río San Juan hasta la ensenada de Guapi) (Puentes et al. 2007). En este tipo de actividad pesquera se encuentran registradas el 27% de la embarcaciones matriculadas en el país (tanto de origen nacional como internacional) (Payan et al. 2008). Aquí se han identificado un gran número de especies de elasmobranquios como fauna acompañante, siendo los batoideos los más abundantes (79% de la captura total de elasmobranquios) (Mejía-falla & Navia 2008a). Dentro de los batoideos capturados la familia Urotrygonidae es la que tiene mayor índice de pesca incidental tiene, ya que representa el 17% de todos los peces cartilaginosos identificados

como fauna acompañante durante las faenas de pesca de camarón de aguas someras (Zarrate 2008).

La familia Urotrygonidae, son comúnmente llamadas rayas espinosas, y se caracterizan por presentar disco redondeado, donde el ancho del mismo es menor que 1.3 veces su largo (Hleap 2010), con uno o dos espinas caudales y numerosas espinas dorsales (McEachran 1995).

La familia Urotrygonidae pertenece a suborden Myliobatoidei y a la superfamilia Urotrygonoidea (Nelson 2006). En esta familia están los géneros *Urobatis* y *Urotryon* siendo la especie *Urotrygon aspidura* objeto de la actual investigación. Las poblaciones *Urotrygon aspidura* se restringen a profundidades bajas (media de 12m), asociada a fondos lodosos en aguas costeras (Mejia-Falla & Navia 2008b). Se ha encontrado que su mayor abundancia está entre la desembocadura del río San Juan y la ensenada de Guapi, donde es común la pesca de camarón de aguas someras (Navia 2002).

A pesar de que muchas especies de la fauna acompañante de la pesca de camarón de aguas someras, tiene algún uso comercial, los urotrygonidos se descartan una vez son capturados. La falta de interés comercial por el género se ve reflejada en los pocos trabajos a nivel genético, poblacional, ecológico, y de historia de vida que se han realizado, conociéndose solo aspectos taxonómicos y biológicos (Mejia- Mercado 2006), hábitos alimentarios, relaciones tróficas y función ecológica de la zona central del océano Pacífico colombiano (Navia 2009), heredabilidad y potencial evolutivo (Hleap 2010) y aspectos biológicos y reproductivos (Mejia-Falla & Navia 2008b).

Estudios poblacionales donde se incluyen marcadores moleculares y aspectos genéticos constituirían una oportunidad para robustecer la información existente y reconocer el

estado de las poblaciones del Pacífico vallecaucano de *Urotrygon aspidura*, en términos de diversidad genética.

La utilización de marcadores moleculares permitiría reconocer aspectos como flujo genético, cambio en la diversidad intra e interpoblacional y asociación histórica entre poblaciones (Arter 1990), lo cual es muy útil en especies expuestas a algún tipo de presión externa, como es el caso de *Urotrygon aspidura*, por tener una alta representatividad como fauna acompañante en las faenas de pesca de camarón de aguas someras en el Pacífico vallecaucano.

Utilidad de las herramientas genéticas en elasmobranquios

Aunque la mayoría de estudios poblacionales y a nivel de especie en elasmobranquios se han basado en datos relacionados las presiones de pesca (Fitzmaurice 1974, Aldebert 1997), el marcaje (Templeman 1984, Little 1995, Duarte et al. 2002) o datos morfológicos, en las últimas dos décadas los estudios donde se incluye técnicas moleculares y aspectos genéticos, ha incrementado sustancialmente, con el ánimo de robustecer la información poblacional disponible en elasmobranquios (Hillis et al. 1996, Holland & Hadfield 2002, Rubinoff & Speling 2002).

En elasmobranquios, como en otros grupos, el estudio de los aspectos genéticos permite conocer los procesos de dispersión y migración que compensan los procesos de extinción, además, de obtener aproximaciones acerca de cuellos de botella y pérdida de diversidad por presiones antrópicas (por ejemplo pesca directa, pesca incidental), endogamia o la probabilidad de supervivencia de las especies (Avise et al. 1995).

Regiones del ADN nuclear se han empleado en el estudio poblacional para determinar aspectos genéticos en elasmobranquios y complementar la información disponible de

algunos géneros. Gracias estas regiones se ha podido observar homogeneidad genética entre poblaciones del golfo de México y las poblaciones del este del Atlántico en *Carcharhinus plumbeus* y en las poblaciones de tiburones del Atlántico de la especie *Rhizoprionodon terraenovae* (Heist et al. 1995, Heist et al. 1996, Heist & Gold 1999). De igual manera, se ha empleado loci microsatélites para determinar la variación dentro de poblaciones de tiburón limón, *Negaprion brevirostris*. (Feldheim et al. 2001) y para determinar la estructura genética en *Charcharinus limbatus* (Keeney et al. 2005), encontrando que existe una baja, pero significativa heterogeneidad en las poblaciones del este del Atlántico en la primera especie y una baja diferenciación entre los loci usados en el segundo caso. Schrey & Heist (2003) también emplearon loci microsatélites para corroborar la evidencia de diferenciación poblacional en tiburones de la especie *Isurus oxyrinchus*.

En otros ámbitos como la necesidad de identificar especies objetivo de algunas prácticas comerciales como el “aleteo” en grandes mercados pesqueros a nivel mundial como el de Hong Kong, se han empleado genes ribosomales nucleares ITS2 para determinar las especies más afectadas y de mayor demanda (Clarke et al. 2006).

Sin embargo, las regiones nucleares presentan una tasa de evolución lenta, por lo que se ha optado por emplear regiones mitocondriales en algunos casos debido a que estas ofrecen ciertas ventajas con respecto a las primeras, por ejemplo una tasa de sustitución nucleotídica mayor, una rápida evolución (Springer et al. 2001) y mayor sensibilidad a la deriva génica (Randi 2000), lo que hace que el análisis de los cambios en la secuencia de aminoácidos de estas regiones sea muy útil para generar aproximaciones acerca del estado de una población, flujo génico, estructura genética, diversidad haplotípica y nucleotídica.

Gracias a ello, distintas regiones mitocondriales han sido empleadas para evaluar el estado poblacional de elasmobranquios y determinar la pérdida de diversidad en las mismas:

Lewallen y colaboradores (2007), revelaron la utilidad de la región control mitocondrial para mostrar la baja diversidad genética en el tiburón leopardo (*Triakis semifasciata*).

Debido a que esta región puede llegar a variar hasta 44% en algunos géneros de elasmobranquios (Valsecchi y et al. 2005), resulta muy útil para estimar diversidad genética en poblaciones, como en el tiburón peregrino (*Cetorhinus maximus*) donde fue posible establecer una baja diversidad haplotípica (Hoelzel et al. 2006).

También se ha empleado otros genes mitocondriales como NADH para complementar de la evidencia morfológica para separar especies en el género *Galeus* (Castilho et al. 2007), genes mitocondriales ribosomales como el 16S rRNA para esclarecer relaciones filogenéticas en familias problemáticas de Charchariniformes (Iglesias et al. 2005) y loci microsatélites para evaluar la estructura genética, encontrando una baja diferenciación entre las poblaciones estudiadas (Chevolot et al. 2006).

Así mismo se ha utilizado el gen citocromo oxidasa *b*, el cual ha demostrado ser un marcador muy útil en análisis filogenéticos de tiburones y rayas (Bernardi & Powers 1992, Kitamura et al. 1996, Sezaki et al. 1999, López et al. 2006) y es uno de los genes empleados para la identificación de especies desconocidas a partir de muestras de tejido o en ocasiones donde no se dispone del organismo completo sino ciertas partes del mismo (Heist & Gold 1999, Hoelzel 2001, Champman et al. 2003, Chan et al. 2003).

Este gen fue utilizado para analizar las variaciones entre tres especies del tiburón dormilón (género *Somnious*) donde se encontró 21 haplotipos en poblaciones del Pacífico norte, en el sur y norte del Atlántico, siendo este estudio de vital importancia para reconocer características de la genética poblacional de un género poco estudiado como este (Murray

et al. 2008). Bessudo & Caballero (2003), emplearon este gen para la confirmación de la especie *Odontaspis ferox* para SFF Malpelo en Colombia. Sin embargo, muchos autores afirman que citocromo oxidasa C subunidad I constituye una herramienta más poderosa para los análisis de genética poblacional que el gen citocromo oxidasa *b*.

Citocromo oxidasa C subunidad I tiene características que contrastan con las de citocromo *b*, debido a que los cambios en la secuencia del primero, ocurre más rápido que en el segundo (Lynch & Jarrell 1993). Gracias a esto, este gen ha sido útil para establecer diferencias dentro de especies del género *Squalus*, encontrando que con el análisis de la divergencia del mismo, se puede explicar hasta el 4% de las diferencias encontradas en las especies analizadas (Ward et al. 2005).

A pesar del gran contenido informativo que posee citocromo oxidasa C subunidad I y de su gran utilidad para la genética poblacional, en algunos grupos de elasmobranquios no se ha empleado con fines poblacionales, como ocurre con el género *Urotrygon*, donde las aproximaciones a su biología molecular son muy pocas.

Dentro de escasa información molecular disponible en este género Hleap (2010) hizo un análisis genético cuantitativo del cambio en la ontogenia de las relaciones morfométricas, la heredabilidad de las medidas más usadas en batoides y la heredabilidad del disco en *Urotrygon* desde una perspectiva geométrica, realizando una exploración estadística univariada y multivariada del fenotipo de 55 madres grávidas y sus crías, encontrando multicolinealidad y concluyendo que los modelos lineales para el análisis de este tipo de estudios resultan muy útiles como predictores de las variables morfométricas de estas rayas, siendo el único trabajo a nivel molecular en este género.

Utilidad del contenido informativo del gen de citocromo oxidasa C subunidad I en elasmobranquios.

Citocromo oxidasa C subunidad I se ha empleado para la identificación de 15 especies de rayas de los géneros *Ambliraya*, *Bathiraja* y *Raja* teniendo en cuenta la variación observada en este gen; 13 de las especies estudiadas mostraron secuencias únicas, lo cual confirma la utilidad de COI para discriminar especies en batoideos (Spies et al. 2006).

En otras familias como Potamotrygonidae, Toffoli y colaboradores (2008), emplearon citocromo oxidasa subunidad I para llevar a cabo un análisis filogenético, encontrando haplotipos compartidos en tres de las especies estudiadas (*Potamotrygon motoro*, *P. scobina*, and *P. orbignyi*), esto llevó a concluir que el análisis de las secuencias de este gen, en compañía con caracteres morfológicos puede ser una herramienta poderosa para discriminar especies y evaluar la diversidad interespecífica.

Se ha propuesto que este gen podría ser útil como “código de barras”, donde se propone usar cebadores universales para amplificar por PCR un fragmento de aproximadamente 500 pares de bases de este gen, para posteriormente ser secuenciado y comparado con secuencias de referencia o “vouchers” para identificar la especie en análisis. Esto ha permitido que 210 especies de elasmobranquios australianos (tanto rayas como tiburones) estén discriminadas e identificadas y que ya tengan su propio código de barras, corroborando que este fragmento es útil para la identificación en condriictios (Ward et al. 2008). Igualmente, el análisis de esta misma secuencia en 388 especies de peces, donde se incluían 61 de elasmobranquios mostró que el gen COI era útil para discriminar entre el 98-99% de las especies (Ward & Holmes 2007).

Otra utilidad del código de barras es la identificación de especies a partir de fragmentos de organismos: Holme y colaboradores (2009) encontraron que esta técnica resulta útil para identificar aletas de tiburones confiscados en Australia y en otros mercados alrededor del mundo, y relacionar cada una de ellas con la especie correspondiente. En Colombia, se llevó a cabo la identificación de especies a partir de incautaciones de aletas obtenidas por pesca ilegal en el Pacífico colombiano, encontrando que la especie más afectada por esta práctica es *Alopias pelagicus* (Caballero et al. 2010).

Actualmente, 1114 especies de elasmobranquios ya tienen su propio código de barras, incluyendo *Urotrygon aspidura* (secuencia reportada en el año 2010), especie cuya información molecular es casi nula.

Sin embargo, en esta especie no se ha empleado este gen para evaluar la diversidad en poblaciones naturales, lo cual la rezaga a desconocimiento casi total de sus dinámicas poblacionales y su diversidad a nivel genético.

OBJETIVOS

Objetivo General

Estandarizar las condiciones de PCR para la amplificación de citocromo oxidasa C subunidad I (COI) en *Urotrygon aspidura* provenientes del Pacífico vallecaucano y evaluar el contenido informativo de esta región mitocondrial.

Objetivos específicos

1. Validar las técnicas de extracción de ADN reportadas para la especie *U. aspidura*.
2. Establecer las condiciones necesarias para la amplificación por PCR de citocromo oxidasa C subunidad I, en especie *U. aspidura* en dos poblaciones del Pacífico vallecaucano.
3. Evaluar el contenido informativo de citocromo oxidasa C, subunidad I, en términos de diversidad nucleotídica y haplotípica para la especie *U. aspidura* en dos poblaciones del Pacífico vallecaucano.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de muestras

Se analizaron 19 muestras de la especie *Urotrygon aspidura*, de las cuales 10 habían sido recolectadas en localidad de La Bocana y 9 en la localidad de Juanchaco en el Pacífico vallecaucano; todas ellas recolectadas mediante pesca artesanal de camarón de aguas someras (Figura 1).

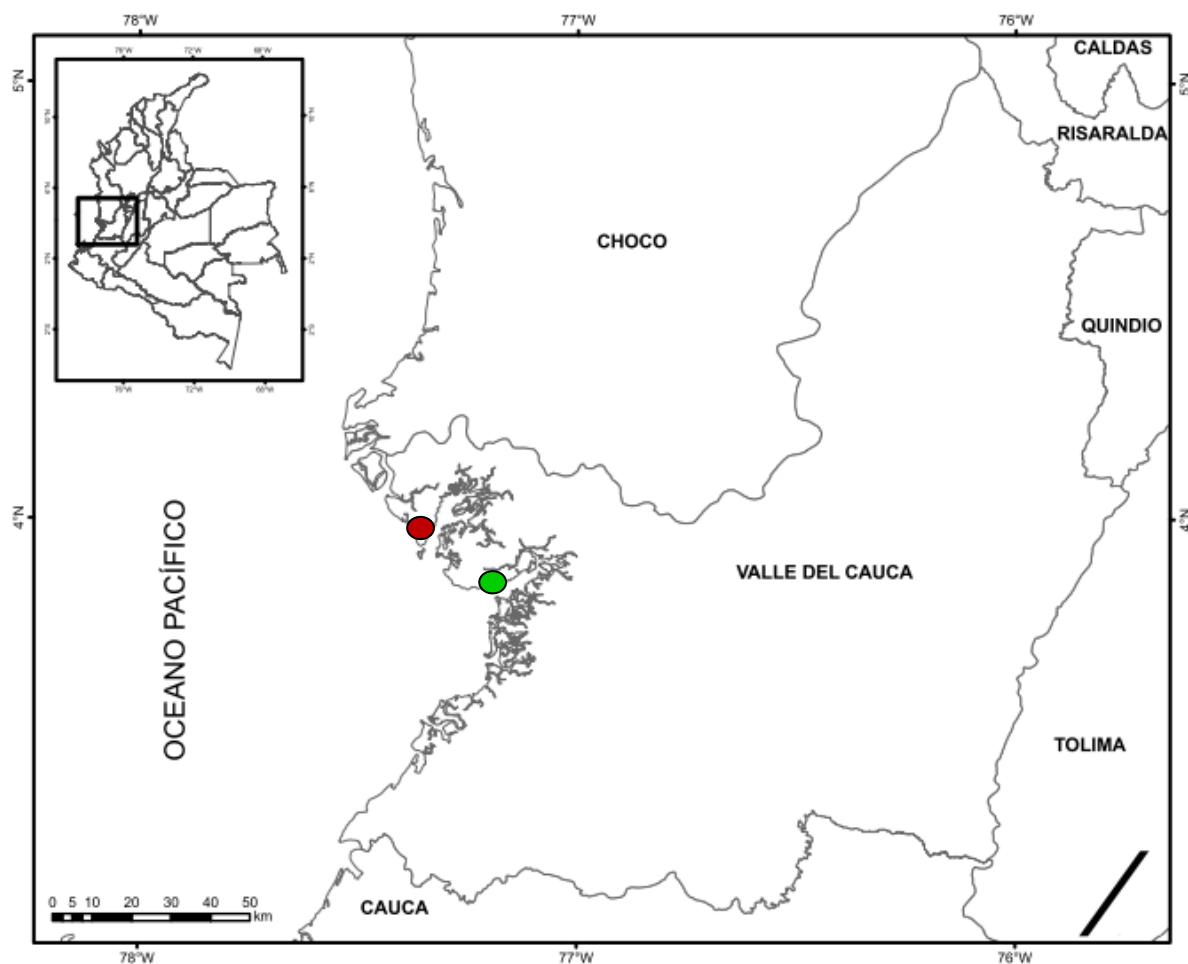


Figura 1. Sitios de recolección de muestras en el pacífico vallecaucano. El ovalo rojo corresponde a la localidad de Juanchaco y el ovalo verde corresponde a la localidad de La Bocana.

De cada individuo se extrajo aproximadamente 1 cm³, se preservó en buffer de Longmire (Longmire et al. 1997) según lo reporta Hleap y colaboradores (2009) y fueron mantenidos a -20° C hasta el proceso de extracción de ADN.

Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó empleando la técnica de proteinasa K, seguida de purificación fenol/cloroformo, teniendo en cuenta las siguientes condiciones reportadas por Hleap y colaboradores (2009) para elasmobranquios: se llevó a cabo la maceración de 25 mg de tejido en N₂ líquido, posteriormente se adicionó 500 µL de buffer de extracción (50 mM tris pH 7.5, 1mM EDTA, NaCl 100 mM, 1%SDS) y se incubó a 55-60°C por toda la noche (entre 12 y 19 horas).

Posteriormente, se adicionó un volumen igual de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) y se incubó a 20-25 °C por cinco minutos. Se centrifugó a 10000 g por cinco minutos, se rescató la fase acuosa y se agregó un volumen igual de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1). Luego, se centrifugó a 9000 g por 5 minutos y tras rescatar la fase acuosa, se agregó un volumen igual de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se mezcló y se incubó a 25°C por 5 minutos y se mezcló nuevamente. Se realizó una centrifugación 7000 g por 3 minutos, la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se agregó un volumen igual de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) y se incubó por 5 minutos a 20-25°C. Posteriormente, se centrifugó a 7000g por 5 minutos y se rescató la fase acuosa a la cual se le agregó 45 µL de acetato de sodio 3M y 1 ml de etanol frío; luego, se incubó de 10-20 minutos a -20°C y se centrifugó a 8000g por 1 minuto. Por último, se secó el “pellet” o botón y se incubó con 250 uL de TE (10 mM tris pH: 8, 1 mM EDTA pH: 8) por una hora a 65°C hasta resuspender. La cuantificación de ADN, se llevó

mediante espectrofotetría, con espectrofotómetro BIORAD. Se estimara la absorbancia a 260 nm, lo cual equivale a 50 µg/ml de DNA de dos hebras (Sambrook et al. 1989), la absorbancia a 280nm, para estimar la pureza del ADN obtenido.

Condiciones iniciales y estandarización de las condiciones de PCR para la amplificación de citocromo oxidasa subunidad I (COI)

La estandarización de la amplificación de citocromo oxidasa (COI) mitocondrial se llevó a cabo partiendo del método propuesto por Quattro y colaboradores. (2006) y modificando las condiciones propuestas por los autores, teniendo en cuenta las siguientes condiciones iniciales: En un volumen final de 50 µL compuesto por 10 ng de ADN, 10 mM Tris (pH 8.3), 2.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0.01% Tritón X-100, 10 pmol del primer *forward* (COIf-5') y *reverse* (COIe-3') (tabla 1), 200 µM de cada dNTP, y 2 U de *Taq* ADN polimerasa. Los cebadores usados fueron los reportados por Palumbi y colaboradores (1996) y cuyas secuencias se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Cebadores empleados en la amplificación de citocromo oxidasa C subunidad I (COI); Los códigos de ambigüedad son R = A/G, W = A/T, y Y = C/T.

| secuencias de cebadores 5' → 3' | fuelle |
|------------------------------------|----------------|
| COIf-5' F: CCTGCAGGAGGAGGAGAYCC | Palumbi (1996) |
| COIe-3' R: CCAGAGATTAGAGGGAATCAGTG | |

La PCR se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: cuatro minutos a 94° C; 40 ciclos de 94°C por un minuto, 58°C por un minuto, 72°C por dos minutos, y una extensión final de siete minutos a 72°C.

Se llevó a cabo la estandarización con cinco muestras de *U. aspidura*, para validar las condiciones. Las variables se cambiaron siguiendo un diseño factorial de tres variables:

cantidad de taq polimerasa, concentración de ADN y concentración de cloruro de magnesio, anidándose por temperatura hibridación: 48°C, 50° C y 52°C.

Por temperaturas se llevaron a cabo en total 36 experimentos, teniendo en cuenta dos concentraciones de taq polimerasa (1,5 U/ul y 2U/ul), dos concentraciones de cloruro de magnesio MgCl₂ (2,5 mM y 2,0 mM) y 9 cantidades de ADN (0,1 ng/ul, 0,5 ng/ul, 2,0 ng/ul, 3 ng/ul, 5ng/ul, 10 ng/ul, 15 ng/ul, 20 ng/ul, y un cantidad final de dos microlitros provenientes de ADN puro, sin diluir.

Una vez estandarizadas las condiciones para la amplificación de citocromo oxidasa subunidad I (COI), se amplificó las muestras restantes y se llevó a cabo la verificación en electroforesis en agarosa al 1% a 110 V por 40 minutos.

Los productos de PCR se purificaron empleando el método de polietilenglicol-etanol al 70% . En este método de purificación se le adicionó un volumen de 50 ul de solución de 20% PEG y 2,5M NaCl a volumen igual de amplificado. Posteriormente, se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos, para luego ser centrifugado a 13.000 rpm por 15 minutos. Una vez centrifugado se sacó el sobrenadante con mucho cuidado, dejando 5 microlitros de la solución para evitar eliminar el ADN. Luego se adicionó 100 microlitros de Etanol al 70% y se centrifugó a 13.000 rpm por 4 minutos. Se secó el sobrenadante. Por último se secó el tubo en una bomba de vacío, se resuspendió el botón en agua para PCR y se visualizó en un gel de agarosa al 1,2%, sirviendo 1 microlitro de la solución.

Una vez purificado se secuenció una de las cadenas de los fragmentos amplificados por medio del servicio de secuenciación MACROGEN (KOREA) y se verificó que provinieran de taxa relacionados a través del algoritmo BLAST disponibles en la página web NCBI (<<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi.consulta>>: 2 de diciembre 2010).

Contenido informativo de citocromo oxidasa subunidad I para estudios poblacionales

Las secuencias obtenidas se editaron con el programa BIOEDIT (Hall 1999) y alineadas con CLUSTAL W (Thompson et al. 1994). Una vez editadas y alineadas, se estimó la diversidad nucleotídica y haplotípica empleando el software DNAsp versión 5.1.1 (Librado & Rozas 2009).

Posteriormente se realizó el análisis de diversidad genética (π), la diversidad haplotípica, variabilidad genética y estimación de polimorfismos a nivel interpoblacional e intrapoblacional usando el paquete estadístico Arlequín versión 3.1.1.

Para determinar el contenido informativo de la región empleada citocromo oxidasa subunidad I (COI) se estimó el estadístico PIC (índice de contenido polimorfismo).

El índice de contenido polimórfico o PIC evalúa la informatividad o capacidad discriminadora de un marcador en la población. Para su cálculo se tuvo en cuenta la ecuación propuesta por Botstein y colaboradores (1980), inferida a partir de las frecuencias relativas de los haplotipos encontrados (ecuación 1). El PIC es una medida de la diversidad genética y provee una estimación del poder discriminatorio del gen o locus emplead, teniendo en cuenta el numero de alelos y sus frecuencias relativas en cada población. Su valor varia de 0 (monomórfico) a 1 altamente (polimórfico o informativo) (Baccatia 2003).

$$PIC = 1 - \left(\sum_{i=1}^n p_i^2 \right) - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2$$

Ecuación 1. Contenido Informativo Polimórfico (Botstein et al. 1980)

Donde, p_i = frecuencia del alelo i y p_j = frecuencia del alelo j .

Adicionalmente, la variación genética se determinó usando un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) (Excoffier et al. 1992). Con este método se puede establecer la variación entre poblaciones y dentro de las mismas

RESULTADOS

Validación de las técnicas de extracción reportadas para *Urotrygon aspidura*.

Tras la extracción de ADN por la técnica digestión con proteinasa K y purificación con fenol-cloroformo, a partir de muestras de tejido muscular almacenado en buffer de Longmire (Longmire et al. 2007) , reportada y estandarizada para rayas por Hleap y colaboradores (2009), se cuantificó el ADN por espectrofotometría. La cantidad de ADN obtenida y la pureza (descrita por la relación proteínas/ADN), fueron óptimas los procesos de PCR solo tres de las muestras mostraron una baja pureza (inferior a 1,50) y una de las muestras mostró una baja cantidad de ADN (inferior a 50 ug/ml) (tabla 2). Sin embargo, los valores obtenidos pueden ser producto de una sobreestimación debido a que el método de cuantificación es indirecto.

Tabla 2. Cantidades de ADN y la relación proteínas/ADN obtenidas tras la extracción de por medio de digestión con proteinasa K y la purificación con fenol-cloroformo estandarizada para rayas por Hleap y colaboradores (2009).

| Muestra | Localidad | Absorbancia 260 | Absorbancia 280 | Pureza | ADN (Ug/ml) |
|----------------|------------------|----------------------------|----------------------------|---------------|------------------------|
| 1 | La bocana | 0,1150 | 0,0740 | 1,5541 | 575 |
| 2 | La bocana | 0,0340 | 0,0150 | 2,2667 | 170 |
| 3 | La bocana | 0,0540 | 0,0350 | 1,5429 | 270 |
| 4 | La bocana | 0,2760 | 0,1870 | 1,4759 | 1380 |
| 5 | La bocana | 0,1980 | 0,1240 | 1,5968 | 990 |
| 6 | La bocana | 0,0043 | 0,0025 | 1,7200 | 21,5 |
| 7 | La bocana | 0,3810 | 0,2380 | 1,6008 | 1905 |
| 8 | La bocana | 0,1730 | 0,1180 | 1,4661 | 865 |
| 9 | La bocana | 0,2270 | 0,1490 | 1,5235 | 1135 |
| 10 | La bocana | 0,0830 | 0,0470 | 1,7660 | 415 |
| 11 | Juanchaco | 0,0230 | 0,0160 | 1,4375 | 115 |
| 12 | Juanchaco | 0,0073 | 0,0054 | 1,3500 | 36,5 |
| 13 | Juanchaco | 0,0075 | 0,0055 | 1,3600 | 37,5 |
| 14 | Juanchaco | 0,2250 | 0,2020 | 1,2600 | 1125 |
| 15 | Juanchaco | 0,0540 | 0,034 | 1,5882 | 270 |
| 16 | Juanchaco | 0,1420 | 0,093 | 1,5269 | 710 |
| 17 | Juanchaco | 0,2280 | 0,149 | 1,5302 | 1140 |
| 18 | Juanchaco | 0,0650 | 0,0457 | 1,4223 | 325 |
| 19 | Juanchaco | 0,1890 | 0,112 | 1,6875 | 945 |

Estandarización de las condiciones de PCR para la amplificación de citocromo oxidasa subunidad I (COI).

Se reprodujeron las condiciones iniciales a las cuales se llevo a cabo la estandarización.

Ninguno de los experimentos realizados a 52°C de hibridación tuvo éxito, cuando se realizó la verificación en electroforesis en gel de agarosa al 1% a 110V por 40 minutos. De los experimentos realizados a 48°C, solo se obtuvo resultado cuando se empleó el ADN sin diluir, empleando 2 unidades de taq polimerasa, tanto en el experimento donde se empleó la concentración de 2,5mM y 2mM.

Sin embargo, se encontró que en los experimentos donde usó 2, 5mM de Cloruro de magnesio hubo bandas inespecíficas y barrido en la parte inferior y superior de la banda esperada de aproximadamente 500 pares de bases (Figura 2). De igual forma, se observaron bandas inespecíficas alrededor de la banda esperada cuando se empleó una concentración de 2,0 mM (figura 3).

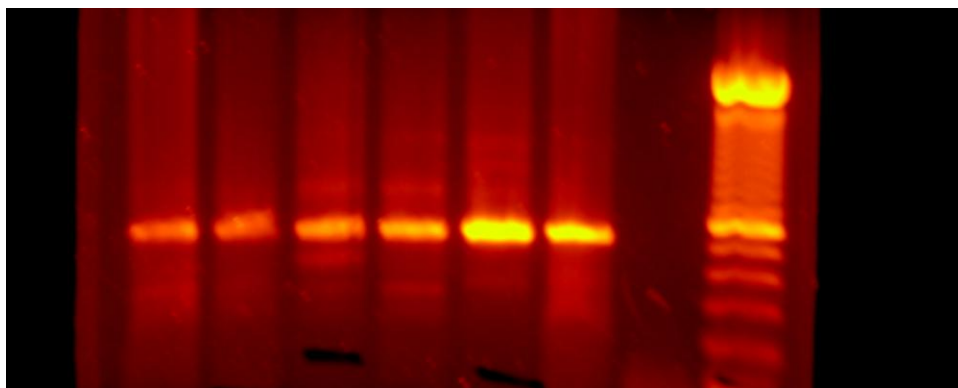


Figura 2. Amplificación de un fragmento de citocromo oxidasa subunidad I , empleando 2,5mM de cloruro de magnesio (MgCl₂), 48°C de temperatura de hibridación, y 2 ul de ADN sin diluir.

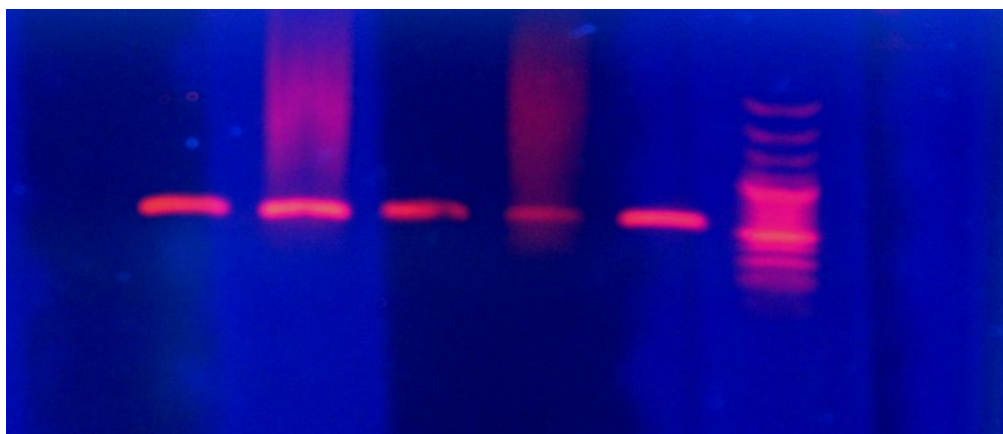


Figura 3. Amplificación de un fragmento de citocromo oxidasa subunidad I , empleando 2,0mM de cloruro de magnesio (MgCl₂), 48°C de temperatura de hibridación, y 2 ul de ADN puro sin diluir.

Ya que la temperatura de hibridación es un factor crítico en la correcta amplificación por PCR y la calidad del producto observado durante la electroforesis, se notó que de los

experimentos realizados a 50°C, solo fue posible obtener producto visible cuando se empleó el ADN puro. Aunque la calidad de las bandas mejoro notablemente, el barrido alrededor de la banda esperada era visible cuando se empleó una concentración de 2,5mM de cloruro de magnesio, sin embargo la intensidad fue menor a la intensidad de las bandas inespecíficas observadas en los ensayos donde se empleo temperatura de hibridación de 48°C (figura 4).

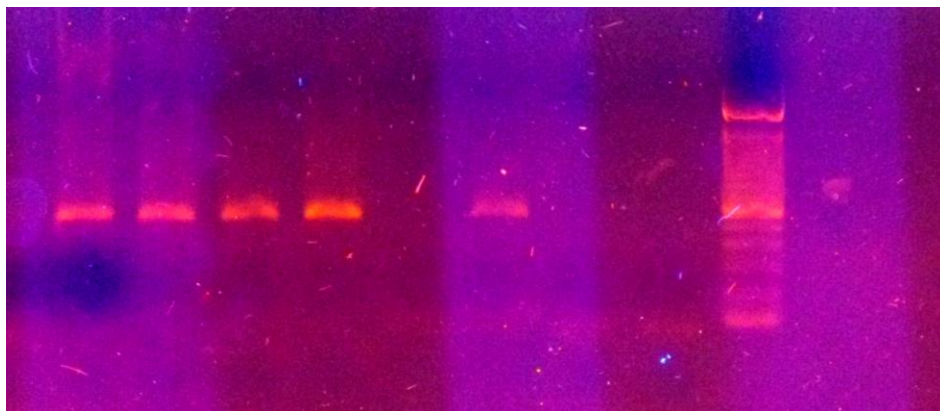


Figura 4. Amplificación de un fragmento de citocromo oxidasa subunidad I , empleando 2,5mM de cloruro de magnesio (MgCl₂), 50°C de temperatura de hibridación, y 2 ul de ADN puro sin diluir.

Cuando se empleó una concentración de 2,0 mM de cloruro de magnesio se encontró que fue posible eliminar la mayor cantidad de inespecificidad y obtener una producto de aproximadamente 500 pares de bases con el menor barrido posible, con ausencia casi total de bandas inespecíficas y de buena calidad al realizar la verificación en electroforesis de agarosa al 1% durante 40 minutos a 110V (Figura 5).

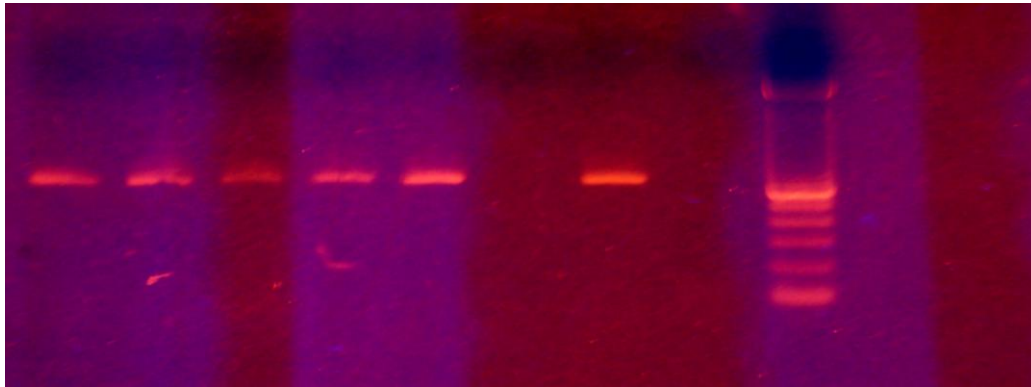


Figura 5. Amplificación de un fragmento de citocromo oxidasa subunidad I , empleando 2,0mM de cloruro de magnesio (MgCl₂), 50°C de temperatura de anelling, y 2 ul de ADN puro sin diluir.

Análisis del contenido informativo de COI para las dos poblaciones de *U. aspidura*

Análisis del contenido informativo polimórfico.

Se realizó el análisis de 19 secuencias de 478 pares de bases de longitud; tras el alineamiento de las secuencias con la herramienta Blast, se encontró que 18 de las 19 muestras analizadas, distribuidas en las dos poblaciones de estudio, mostraban una similitud máxima del 86% con *Potamotrygon motoro*. El individuo cuya alineación no era igual a las demás, presentaba una similitud máxima de 86% con *Himantura schmardae*. El análisis de la población La bocana (n=10) y Juanchaco (n=9, incluyendo el individuo cuya alineación fue diferente) del Pacífico vallecaucano, mostró para la primera población 3 sitios polimórficos, 4 haplotipos y 475 de 478 pares de bases eran sitios no informativos o invariables.

Para la población de Juanchaco, se encontró 36 sitios polimórficos y 6 haplotipos; 30 transiciones y 6 transversiones (tabla 3), de los 478 pares de bases 442 eran invariables.

Por ello se realizó, otro análisis sin este individuo, encontrándose 5 haplotipos y 4 sitios polimórficos, de los cuales dos de ellos son *singletons* y dos sitios informativos parsimoniosos; así como 1 transversión y 3 transiciones (tabla 4).

Tabla 3. Resumen del análisis intraespecífico para *Urotrygon aspidura* en las dos poblaciones analizadas: Juanchaco y La bocana para el gen COI, donde se muestra N: tamaño muestral, S: número de sitios polimórficos, porcentaje de Citocina (C), porcentaje de Guanina (G), porcentaje de Timina (T), porcentaje de Adenina (A). Adicionalmente se muestra los mismos valores para la población de Juanchaco excluyendo el individuo problema.

| | La bocana | Juanchaco | Juanchaco excluyendo individuo problemático |
|-----------------------------|-------------|--|---|
| N | 10 | 9 | 8 |
| %C | 25,75 | 25,49 | 25,61 |
| %G | 17,32 | 17,67 | 17,56 |
| %T | 31,17 | 30,79 | 30,77 |
| %A | 25,75 | 26,05 | 26,06 |
| Sustituciones | 3 | 36 | 4 |
| Transiciones | 2 | 30 | 3 |
| Transversiones | 1 | 6 | 1 |
| Sitios polimórficos | 30, 67, 312 | 6, 21, 24, 25, 27, 30, 45, 54, 61, 96, 99, 111, 117, 189, 222, 225, 234, 264, 294, 315, 324, 328, 354, 375, 378, 384, 402, 408, 421, 426, 430, 435, 444, 447 | 61, 62, 411, 421 |
| Número de haplotipos | 4 | 6 | 5 |
| S | 3 | 36 | 4 |

Se realizó el análisis de diversidad nucleotídica y diversidad haplotípica para ambas poblaciones así como la prueba de neutralidad de Tajima (Tabla 4).

Tabla4. Diversidad haplotípica y nucleotídica y prueba del modelo neutral de Tajima para las dos poblaciones estudiadas. Abajo se muestra los mismos análisis para la población de Juanchaco excluyendo el individuo problema.

| | La Bocana | Juanchaco | Promedio | Desviación estándar |
|---------------------------------|------------------|------------------|-----------------|----------------------------|
| Tamaño de la población | 10 | 9 | 9,5000 | 0,7071 |
| Diversidad haplotípica | 0,5330 | 0,8890 | 0,7110 | 0,2517 |
| Diversidad nucleotídica | 0,6 | 8,6111 | 4,6055 | 5,6647 |
| Tajima's D | -1,5622 | -1,7668 | -1,6645 | 0,1446 |
| Tajima's D p-valor | 0,0450 | 0,01 | 0,0275 | 0,0248 |
| Tamaño de la población * | | 8 | | |
| Diversidad haplotípica* | | 0,857 | | |
| Diversidad nucleotídica* | | 2,036 | | |
| Tajima's D* | | 0,18224 | | |

* Excluyendo el individuo problemático

Análisis del contenido informativo a nivel interpoblacional.

Se estimó las frecuencias relativas y absolutas de cada haplotipo para cada una de las poblaciones analizadas excluyendo el individuo con resultados ambiguos; así mismo se calculó el estadístico PIC para la población de Juanchaco, La bocana y la población total (Tabla 5.)

Por otra parte se estimó las frecuencias relativas y absolutas de cada uno de los haplotipos excluyendo la muestra problemática de la población de Juanchaco (tabla7).

Tabla 5. Frecuencias relativas y absolutas de cada uno de los haplotipos encontrados en las poblaciones de Juanchaco y La bocana excluyendo la muestra problemática de la población de Juanchaco.

| haplotipo | Frecuencias Absolutas | | | frecuencias relativas | | | |
|-------------|-----------------------|-----------|------------|-----------------------|---------------------|---------------|---------------------|
| | Poblaciones | | | Poblaciones | | | |
| | La bocana | Juanchaco | Suma | La bocana | | Juanchaco | |
| | n= 10 | n = 8 | | Frecuencia | Desviación estándar | Frecuencia | Desviación estándar |
| 1 | 7 | - | 7 | 0,7000 | 0,1528 | 0,0000 | - |
| 2 | 1 | - | 1 | 0,1000 | 0,1000 | 0,0000 | - |
| 3 | 1 | - | 1 | 0,1000 | 0,1000 | 0,0000 | - |
| 4 | 1 | - | 1 | 0,1000 | 0,1000 | 0,0000 | - |
| 5 | - | 3 | 3 | 0,0000 | - | 0,3750 | 0,1667 |
| 6 | - | 1 | 1 | 0,0000 | - | 0,1250 | 0,1111 |
| 7 | - | 1 | 1 | 0,0000 | - | 0,1250 | 0,1111 |
| 8 | - | 1 | 1 | 0,0000 | - | 0,1250 | 0,1111 |
| 9 | - | 2 | 2 | 0,0000 | - | 0,2500 | 0,1470 |
| Suma | 10 | 8 | 18 | 1,0000 | | 1,0000 | |
| | | | PIC | 0,4500 | | 0,7119 | |

Adicionalmente, se estimó la frecuencia de cada uno de los haplotipos en la población total y el índice de contenido polimórfico (PIC) (Tabla 6).

Tabla 6. Frecuencias haplotípicas en la población total, excluyendo el individuo problemático de la población de Juanchaco. Se muestra el estadístico PIC para la población total.

| haplotipo: | Población total | |
|-------------|-----------------|---------------------|
| | Frecuencia | Desviación estándar |
| 1 | 0,3889 | 0,4875 |
| 2 | 0,0556 | 0,2291 |
| 3 | 0,0556 | 0,2291 |
| 4 | 0,0556 | 0,2291 |
| 5 | 0,0000 | 0,0000 |
| 6 | 0,1667 | 0,3727 |
| 7 | 0,0556 | 0,2291 |
| 8 | 0,0556 | 0,2291 |
| 9 | 0,0556 | 0,2291 |
| 10 | 0,1111 | 0,3143 |
| Suma | 1,0000 | |
| PIC | 0,8168 | |

Se llevó a cabo la AMOVA para determinar qué tanto de la variación estaba explicada por la variación entre poblaciones y que tanto por la variación dentro de las poblaciones, se calculo el índice de fijación F_{ST} de 0.99633 y que el mayor aporte lo hace la población de La bocana cuyo índice de F_{ST} es de 0,99654 similar al F_{ST} específico de Juanchaco (Tabla 7).

Tabla 7. Estadísticos producidos por AMOVA para cada población y el índice FST para cada una de ellas, excluyendo el individuo problemático

| fuelle de variación | g.l. | suma de cuadrados | Componente de la variación de la varianza | porcentaje | P |
|--------------------------------|---------------|------------------------------|--|-------------------|----------|
| entre poblaciones | 1 | 1.483,397 | 166,813 | Va = 99,630 | <0,0001 |
| dentro de las poblaciones | 16 | 9,825 | 0,614 | Vb = 0,370 | |
| Total | 17 | 1.493,222 | 167,727 | | |
| Índice de fijación FST | | 0,99633 | | | |
| Población | Nombre | | FST | | |
| 1 | La bocana | | 0,99654 | | |
| 2 | Juanchaco | | 0,99607 | | |

DISCUSIÓN

La cantidad de ADN obtenido y su pureza, medido por la relación espectrofotométrica de la absorbancia a 260nm (absorbancia del ADN) y a 280nm (absorbancia de las proteínas) (tabla 2), mostró que el método empleado de extracción donde se lleva a cabo una digestión con proteinasa K y lavados ulteriores con fenol-cloroformo es efectiva para tejidos de esta especie.

La relación entre estas dos medidas de absorbancia debe ser superior a 1,5 para considerar que la muestra de ADN tiene una alta pureza. En este caso, se encontró que solo tres de las muestras no cumplían con este parámetro.

Teniendo en cuenta que el rango de tiempo que las muestras fueron almacenadas por un periodo superior a un año a una temperatura de -20, se corrobora que el método de preservación al cual fueron expuestos las muestras de 1cm³ de músculo es efectivo para periodos largos y que posibilita la obtención de ADN óptimo en términos de calidad y cantidad. Esto valida los datos reportados por Hleap (2009) donde se concluyó que el mejor método de preservación de tejido muscular es en el buffer de Longmire (el mismo buffer en el cual fue almacenado las muestras), y que la digestión con proteinasa K y la limpieza con fenol-cloroformo, resulta muy útil para propósitos moleculares en elasmobranquios. Sin embargo cabe señalar, que estos valores pueden ser producto de una sobreestimación, ya que el método de cuantificación de ADN fue indirecto.

Por su parte la estandarización de las condiciones de PCR para la amplificación de citocromo oxidasa C subunidad I (COI), la temperatura de hibridación es un factor crítico, esta es la razón por la cual ninguno de los experimentos desarrollados a la temperatura de 52°C mostró resultado en la verificación en electroforesis de agarosa al 1%.

El hecho que solo los ensayos donde empleo el ADN puro y no con las diluciones, puede atribuirse a una sobreestimación de la cantidad de ADN presente en la muestra ya que la cuantificación del mismo se llevó a cabo con un método indirecto como la espectrofotometría que no evalúa la cantidad de ADN directamente, haciendo que el cálculo de la misma se haya hecho en base a datos que no corresponden con la cantidad real extraída.

Por otra parte se pudo corroborar que temperaturas de hibridación muy elevadas pueden ocasionar que el cebador no se alinee correctamente con la región que se quiere amplificar y por ende no haya resultado: El primer ensayo que mostró producto visible en la electroforesis en agarosa fue donde se empleó 48°C como temperatura de hibridación, una concentración de 2,5 mM de cloruro de magnesio (MgCl_2) y 2 microlitros (ul) de ADN puro como volumen final de cada muestra.

Sin embargo este producto de PCR presentó inconsistencias (barrido alrededor de la banda esperada y bandas de tamaño superior e inferior que la misma de menor intensidad) (Figura 2). Esto puede ser resultado de dos factores: un exceso de magnesio y una temperatura de hibridación muy baja, por esto se empleó una concentración menor de cloruro de magnesio encontrándose, que efectivamente la inespecificidad desaparecía, pero aun persistía el barrido por encima de la banda esperada (figura 3); cuando se incrementó la temperatura a 50°C y se mantuvieron las condiciones iniciales de MgCl_2 (2,5 mM) y taq polimerasa en los experimentos subsiguientes se encontró que la banda espada era más nítida y el barrido desaparecía casi en su totalidad (figura 4).

Para el mismo ensayo (50°C) pero variando la concentración de cloruro de magnesio a 2,0 mM, se encontró que se obtuvo el mejor resultado, siendo esta la mejor combinación para la amplificación exitosa del fragmento citocromo oxidasa subunidad I (COI) para

Urotrygon aspidura (figura 5). Lo cual corrobora que el cloruro de magnesio y la temperatura de hibridación, al ser cofactor de la taq polimerasa es un factor crítico en la obtención de producto de buena calidad.

Todos los haplotipos encontrados fueron únicos para cada población, lo cual podría sugerir que se trata de poblaciones diferentes, sin embargo, sería pertinente un ensayo donde se incrementa el número de individuos analizados.

La alineación de las secuencias con el algoritmo BLAST mostró que una de las muestras tenía una identidad diferente a las demás muestras. Para determinar qué tan grande era la variación introducida por este individuo, los análisis poblacionales se hicieron por duplicado: teniendo en cuenta este individuo “problemático” y excluyendo el mismo.

Para la población de La bocana se encontraron 4 haplotipos y tres sitios polimórficos de las mutaciones observadas en esta población hubo 2 transiciones y 1 transversion. Para la población de Juanchaco, incluyendo el individuo problemático, se encontraron 36 sitios polimórficos y seis haplotipos. Sin embargo, 32 de estos sitios polimórficos se concentraban en un solo individuo problemático cuya alineación en Blast no era igual al resto de los individuos. Cuando se excluyó este individuo se encontró que el número de haplotipos se reducía a cinco, y los sitios polimórficos se reducían a cuatro (tabla3). Eso muestra que al incluir al individuo problemático en los análisis, los sitios polimórficos se reducen en un 88,8%.

La gran variación introducida por este individuo podría sugerir que este pertenece a un grupo taxonómico cuya identidad genética es disímil al de *Urotrygon*.

Se realizó el análisis de diversidad nucleotídica y diversidad haplotípica, se encontró que la población de La bocana tenía menor diversidad nucleotídica ($\pi=0,6$) que la población de Juanchaco tanto cuando se incluía el individuo problemático ($\pi=8,6111$), como cuando se

excluía de los análisis ($\pi=2,036$); aunque en este último caso la diversidad nucleotídica se redujo a la mitad seguía siendo superior a la de La bocana. Así mismo la población de La bocana presentaba una menor diversidad haplotípica (Tabla 4).

Esto puede atribuirse a que esta localidad está en la zona centro norte del pacífico vallecaucano, donde se desarrolla la pesca de camarón de aguas someras, y la extracción de individuos es más intensa. Se estima que en esta zona se realizan 24 lances cada tres días mientras que en la zona norte (región donde se encuentra la localidad de Juanchaco) la intensidad de pesca es menor (Díaz et al. 1998)

En la región donde se desarrolla esta actividad pesquera la plataforma continental presenta una suave pendiente hasta 40 brazas (aproximadamente 72 m) de profundidad, siendo más estrecha en Buenaventura y ampliándose en un triángulo hacia el sur con fondos principalmente lodosos (Pineda 1990). En esta zona se extiende una llanura rellena parcialmente por sedimentos marinos y salobres del terciario que determinan que la costa sea baja, con playas arenosas y fondos fangosos (Díaz et al. 1998).

Siendo este tipo de suelos predilectos por la especie *Urotrygon aspidura*, La bocana se convierte en un sitio propicio para la misma, que contrasta con la gran intensidad de pesca de camarón de aguas someras (actividad a la cual *U. aspidura* se encuentra asociada como fauna acompañante), lo cual podría estar afectando la diversidad genética encontrada aquí. Cuando se incluye el individuo problemático, la prueba de neutralidad de Tajima mostró que la población de La bocana posee un valor superior al de la población de Juanchaco y diferencias significativas. Una vez este individuo es excluido no hay diferencias significativas para ninguna de las dos poblaciones, y el valor para la población de La bocana pasa a ser inferior que el de la población de Juanchaco.

Este último hallazgo, donde hay diferencias significativas muestra que las secuencias podrían estar evolucionando bajo un proceso aleatorio sin presiones de selección direccional, expansión ni contracción demográfica, sin embargo, el N (tamaño poblacional empleado) no es lo suficientemente grande para realizar esta aseveración categóricamente.

El estadístico D tajima tanto para la población de La bocana como para la población de Juanchaco mostró valores negativos (-1,5622 para La bocana y -1,7668 para Juanchaco) cuando se tiene en cuenta el individuo problemático, esto sugiere que la inclusión de este individuo apunta a que si existen presiones selectivas o una selección purificadora débil, lo cual contradice los resultados hallados cuando se excluye el mismo (Tabla 4).

Algunos autores enfatizan en que muestras poblacionales pequeñas, podrían ocasionar que este índice mostraran valores negativos (Ptak & Przeworski 2002, Hammer et al 2003). Sin embargo, cuando se excluye el individuo problema, el valor de este estadístico se torna positivo para la población de Juanchaco, corroborando que este individuo introduce una gran variación en los análisis y es pertinente excluirlo de los análisis posteriores, es decir en los análisis interpoblacionales.

A nivel interpoblacional se empleó el estadístico PIC (índice polimórfico), y se realizó el análisis molecular de varianza (AMOVA) para evaluar la variación entre poblaciones y dentro de las mismas.

Ya que la utilidad de cualquier tipo de gen, en el análisis poblacional depende de su grado de “informatividad”, es decir el grado de variabilidad que presente en las poblaciones naturales, y esta “informatividad” se podría estimar con el parámetro estadístico PIC (índice polimórfico) (Peralta & Piqueras 2002), se puede decir que el fragmento del gen citocromo oxidasa subunidad I empleado, posee una alta “informatividad” para la población

de Juanchaco (PIC=0,7119); sin embargo la “informatividad” de este gen para la población de La bocana es limitada (PIC=0,45) , y su valor es muy alto cuando se evalúa en función de las dos poblaciones mostrando que es útil e informativo para discriminar poblaciones. (Tabla 5).

El poder discriminatorio de citocromo oxidasa C, subunidad I, ya había sido comprobado en otras en el género *Raja* a nivel de especie (Spies et al. 2006). Así mismo se ha encontrado alto grado de polimorfismo en rayas de agua dulce de la familia potamotrygonidea empleando COI (Toffoli et al. 2008) y haplotipos únicos en otros géneros de elasmobranquios poco estudiados, lo que muestra que el gen no solo es útil para discriminar poblaciones en *Urotrygon aspidura* sino en otros batoideos.

En rayas del género *Dasyatis* se encontró que la diversidad intraespecífica explicada por el gen COI oscila entre 3- 4% y que especies es posible diferenciar especies muy cercanas o incluso grupos filogeográficos de una misma especies (Ward et al. 2008).

Herbert y colaboradores (2003) evaluaron la utilidad de COI no solo en elasmobranquios sino en otros taxa, validando que es útil para la discriminación de especies y poblaciones en el 98% de los casos. Estos estudios, enfatizan en que este gen presenta una evolución rápida que lo hace un marcador adecuado para realizar estudios a nivel intraespecífico y entre especies próximas (Avice 2000, Hebert et al. 2003, Vences et al. 2005, Rubinoff 2006), lo anterior y el valor del índice de contenido polimórfico (PIC) para el caso particular de *Urotrygon aspidura* corrobora el poder informativo y discriminatorio de este gen y sugiere que existe la posibilidad de encontrar una alta variabilidad intraespecífica en las secuencias de este gen y así utilizarlo como un marcador genético para establecer diferencias dentro y entre poblaciones .

Tras realizar AMOVA se encontró que la mayor diversidad se encuentra explicada por la variación entre poblaciones (99,6%) siendo la población de La bocana la que aporta más. (Tabla 6). Las marcadas diferencias entre las población de La bocana y la de Juanchaco, siendo la población de La bocana menos diversa en términos de diversidad haplotípica y nucleotídica, puede deberse a que en ese sitio la extracción de individuos es mas intensiva.

Hacia la parte norte del puerto de Buenaventura, donde se ubica esta localidad, se encuentran más lugares aptos para la captura de camarones de aguas profundas y someras, haciendo que las embarcaciones prefieran el desplazamiento hacia esta parte de la costa (Díaz et al. 1998). Lo cual disminuye la diversidad en las poblaciones la fauna acompañante asociada a esta pesquería en esta zona. Estudios moleculares, empleando el gen COI, donde se incluyan otras especies del genero *Urotrygon* en estas dos localidades podría robustecer la información poblacional en la familia, y generar aproximaciones acerca del efecto de las presiones antrópicas como la pesca en la diversidad del genero en e pacifico vallecaucano.

En otros batoideos se ha encontrado baja diversidad en zonas donde la intensidad pesquera es más intensa. Valsecchi y colaboradores (2005) encontraron para *Raja miraltus* una menor diversidad haplotípica y nucleotídica en zonas del mediterráneo donde la pesca extractiva era más intensiva.

CONCLUSIONES

- El gen citocromo oxidasa C subunidad I (COI) posee un alto contenido informativo polimórfico, útil para evaluar la diversidad haplotípica y nucleotídica en poblaciones de *Urotrygon aspidura* en el pacifico vallecaucano.
- Se recomienda muestreos más grandes con el ánimo de incrementar el tamaño de la muestra poblacional empleada, evitar sesgo y arrojar aproximaciones más categóricas sobre la diversidad genética en esta especie.
- La población de La Bocana presenta una diversidad haplotípica y nucleotídica menor con respecto a la población de Juanchaco debido posiblemente a una intensidad pesquera mayor en esta zona. Sin embargo, es necesario comparar los datos aquí obtenidos, con estudios de se evalué la intensidad pesquera en el pacifico vallecaucano.
- Los haplotipos encontrados son únicos para las dos poblaciones de *Urotrygon aspidura* evaluadas en este estudio, lo cual sugiere un diferenciación poblacional en estos sitios de muestreo. Es necesario incrementar la muestra poblacional empleada para generar información más certera.
- Estudios donde se incluyan otras especies del genero *Urotrygon* en estas dos poblaciones robustecería la información poblacional en términos de diversidad genética y haplotípica para esta familia en el pacifico vallecaucano

LITERATURA CITADA

ALDEBERT, Y. 1997. Demersal resources of the Gulf of Lions (NW Mediterranean). Impact of exploitation of fish diversity. *Vie Milieu*, 47: 275–284.

ARMSTRONG K. & BALL S. 2005. DNA barcodes for biosecurity: invasive species identification. *Phil. Trans. R. Soc. B* 360: 1813-1823.

ARTER, H. E. 1990. Spatial relationship and gene flow paths between populations of the alpine snail *Arianta arbustorum* (Pulmonata: Helicidae). *Evolution* 44, 966-980.

AVISE, J. C., S. M. HAIG, O. A. RYDER, M. LYNCH, & C. J. GEYER. 1995. Descriptive genetic studies: applications in population management and conservation biology. Pags 183–244 en J. D. Ballou, M. Gilpin, and T. J. Foose, (eds.). *Population management for survival and recovery*. Columbia University Press. USA.

AVISE, J.C. 2000. *Phylogeography. The History and Formation of Species*. Harvard University Press. 120-135.

BELTRÁN, F., J. RICE & R. HONEYCUTT. 1996. Taxonomy of the Iberian lynx. *Nature*, 379: 407-408.

BERNARDI G. & POWERS D.A. 1992. Molecular phylogeny of the prickly shark, *Echinorhinus cookei*, based on a nuclear (18S rRNA) and a mitochondrial (cytochrome *b*) gene. *Mol Phylogenet Evol* 2:161–167.

BESSUDO S. & S. CABALLERO. 2003. Primeras observaciones en su medio natural del Tiburón *Odontaspis ferox* (familia odontaspidae) y confirmación taxonómica por método de identificación molecular en el santuario de fauna y flore Isla Malpelo, Pacífico Colombiano. En: X congreso latinoamericano de ciencias del mar 2003, Costa Rica, p. 298.

BOTSTEIN, D., L. WHITE, M. RSKOLNICK & R. W. DAVIS 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*. 32: 314-331.

BREHM A., J. HARRIS, C. ALVES, J. JESUS, F. THOMARAT & L. VICENTE 2002. Structure and Evolution of the Mitochondrial DNA Complete Control Region in the Lizard *Lacerta dugesii* (Lacertidae, Sauria). *Journal of molecular evolution*. 56: 46-53.

CABALLERO, S., PRADA D., BESSUDO S. & SOLER G. 2010. Identificación molecular de especies de tiburones del pacifico colombiano afectadas por el aleteo extractivo. En: II Encuentro colombiano sobre condricios. Agosto 16-20 2010. Cali, Colombia. 61 p.

CANOVAS F., DE LA RUA P., SERRANO J. & GAILAN J. 2002. Variabilidad del ADN mitocondrial en poblaciones de *Apis mellifera* ibérica de Galicia, España. Archivos de zootecnia, 51 (196): 441-448.

CASTILHO, R., FREITAS, M., SILVA G., FERNANDEZ-CARVALHO, J. & R. COELHO. 2007. Morphological and mitochondrial DNA divergence validates blackmouth, *Galeus melastomus*, and Atlantic sawtail catsharks, *Galeus atlanticus*, as separate species. Journal of Fish Biology 70(Suppl. C): 346–358.

CASTRO, A., B. STEWART, S. WILSON, R. E. HUETER, M. MEEKAN, P. MOTTA, B. BOWEN & K. KARL. 2007. Population genetic structure of Earth's largest fish, the whale shark (*Rhincodon typus*). Molecular Ecology 16:5183-5192.

CESPEDES A., T. GARCIA, E. CARRERA, I. GONZALEZ, B. SANZ, P. HERNANDEZ & R. MARTIN. 1998. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of a short fragment of the cytochrome b for identification of flatfish species. Journal food prot 61:1684-1685.

CHAN, R.W.K., P.I. DIXON, J.G. PEPPERELL & D.D. REID. 2003. Applications of DNA-based techniques for the identification of whaler sharks (*Carcharhinus* spp.) caught in protective beach meshing and by recreational fisheries off the coast of New South Wales. Fish Bull 101:910–914.

CHAPMAN, D.D., D.L. ABERCROMBIE, C.J. DOUADY, E.K. PIKITCH, M.J. STANHOPE & M.S. SHIVJI. 2003. A streamlined, bi-organelle, multiplex PCR approach to species identification: application to global conservation and trade monitoring of the great white shark, *Carcharodon carcharias*. Conservation Genetics 4:415–425.

CHAN K., S. JUNG, Y. LEE, C. JOO LEE, J. PARK & J. LEE 2005. The complete mitochondrial genome of the rayfish *Raja porosa* (Chondrichthyes, Rajidae)., " DNA sequence 16 (3): 187-194.

CHASE, M. W., N. SALAMIN, M. WILKINSON, J. M. DUNWELL, R. P. KESANAKURTHI, N. HAIDAR & V. SAVOLAINEN. 2005. Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals. *Phil. Trans. R. Soc. B* 360: 1889-1895.

CHEVOLOT M., G. HOARAU, D. RIJNSDORP, W. STAM & J. OLSEN. 2006. Phylogeography and population structure of thornback rays (*Raja clavata* L., Rajidae). *Molecular ecology*. 15, 3693-3705.

CHOW S., H. N. OKAMOTO, K. MIYABE, A. HIRAMATSU & N. BARUT. 2000. Genetic divergence between atlantic and indo-pacific stocks of big eye tuna (*Thunnus obesus*) and admixture around south africa. *Molecular ecology*. 9: 221-227.

CLARKE, S.C., MAGNUSSEN J.E., ABERCROMBIE D.L., McALLISTER M.L., & SHIVJI M. S. 2006. Identification of Shark Species Composition and Proportion in the Hong Kong Shark Fin Market Based on Molecular Genetics and Trade Records. *Conservation Biology* 20(1), 201-211

COMPAGNO, L.J. 2005. Check list of living elasmobranchs. Pàgs. 503-548. En W.C. hamlet (Ed.). *reproductive biology and phylogeny of Chondrichthyes: Sharks, batoids and chimeras*. Science publishers. Enfield. UK.

CONDON, M., D.C. ADAMS, D. BANN, K. FLAHERTY, J. GAMMONS, J. JOHNSON, M.L. LEWIS, S. MARSTELLER, S.J. SCHEFFER, F. SERNA & S. SWENSEN. 2008. Uncovering tropical diversity: six sympatric cryptic species of *Blepharoneura* (Diptera: Tephritidae) in flowers of *Gurania spinulosa* (Cucurbitaceae) in eastern Ecuador. *Biological Journal of the Linnean Society* 93: 779-797.

CONN, J.E. & L. MIRABELLO. 2007. The biogeography and population genetics of neotropical vector species. *Heredity* 99: 245-256.

DE LA RÚA P., SERRANO J. & GALLAN J. 1998. Mitochondrial DNA variability in canary island honeybees (*Apis mellifera*), *Molecular ecology*, 7:1543-1547

DÍAZ, J., VELASCO, C. & RAMÍREZ, A. 1998. Monitoreo de la pesquería del camarón de aguas someras del Pacífico Colombiano en 1997. INPA - Buenaventura. Informe Técnico, p. 32 INPA, Buenaventura.

DUARTE P. N, A. SILVA & G.M. MENEZES. 2002. First results of tagging program on tope shark *Gleorhinus galeus* and thornback ray, *Raja clavata*, in Azorean waters. 4th meeting of European elasmobranchs association proceedings. M. vacchi, G. La-mesa, F. Serena & B. Seret (eds). Paris, Frances, p. 197

ELLINGSON, R.A. & P.J. KRUG. 2006. Evolution of poecilogony from planktotrophy: cryptic speciation, phylogeography, and larval development in the gastropod genus *Alderia*. *Evolution* 60(11): 2293-2310.

EXCOFFIER, L., SMOUSE, P. & QUATTRO, J. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial restriction data. *Genetics* 131: 479-491.

FELDHEIM K., GRUBER S. & ASHLEY M. 2001. Population genetic structure of the lemon shark (*Negaprion brevirostris*) in the western Atlantic: DNA microsatellite variation. *Molecular Ecology*, 10, 295–303.

FITZMAURICE, P. 1974. Size distribution and food of thornback rays (*Raja clavata* L.) caught on rod and line on the Mayo coast. Dublin-Ireland Stationery Office, Ir. Fish. Investig. Ser. B, No. 11.

GARNEY L., COMUET J. & SOLIGNAC M. 1992. Evolutionary story of the honey bee *Apis mellifera* inferred from mitochondrial DNA analysis. *Molecular ecology*. 1:145:154.

GARNEY L., MOSSHINE E. & CORNUET. 1995. Mitochondrial DNA variation in Moroccan and Spanish honey bee populations. *Molecular Ecology*. 4:465-471.

GREGORY T. 2005. DNA barcoding does not compete with taxonomy. *Nature*. 434: 1067.

GRIJALVA-CHON, M., A. KAICHI, & K. NUMACHI. 2002. Homogeneidad genética en tiburón angelito (*Squatina californica*) del Golfo de California, evidenciada por análisis PCR-RFLP de la región control del ADN mitocondrial. *Ciencia y Mar*. 11: 37-42.

GRUS, W., G.GRAVES & T. GLENN. 2009. Geographic Variation in the Mitochondrial Control Region of Black-Throated Blue Warblers (*Dendroica caerulescens*) [the Auk](#) Jan. 126 (1): 198-210.

HAMMER, M., BLACKMER F., GARRIGAN D., NACHMAN M. & WILDER J. 2003. Human Population Structure and Its Effects on Sampling Y Chromosome Sequence Variation. *Genetics* 164: 1495–1509.

HALL, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*.41:95–98.

HEBERT, P. D. N., CYWINSKA, A., BALL, S. L. & DE WAARD, J. R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. B* 270, 313–322.

HEBERT, P. & GREGORY T. 2005. The promise of DNA barcoding for Taxonomy. *Systematic Biology*. 54(5): 853-859.

HEBERT, P. D. N., PENTON, E. H., BURNS, J. M., JANZEN, D. H. & HALLWACHS, W. 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 101, 14 812–14 817.

HEIST E. & GOLD J.1999. Microsatellite DNA variation in sandbar sharks (*Carcharhinus plumbeus*) from the Gulf of Mexico and mid-Atlantic Bight. *Copeia*, 1, 182–186.

HEIST E., GRAVES J.& MUSICK J.1995. Population genetics of the sandbar shark (*Carcharhinus plumbeus*) in the Gulf of Mexico and mid-Atlantic Bight. *Copeia*, 3, 555–562.

HEIST E., MUSICK J.& GRAVES J.1996. Mitochondrial DNA diversity and divergence among sharpnose sharks, *Rhizoprionodon terraenovae*, from the Gulf of Mexico and mid-Atlantic Bight. *Fishery Bulletin*, 94, 664–668.

HILLIS, D. M., C. MORITZ, AND B. K. MABLE. 1996. Molecular systematics. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. HAJIBABAEI, M., D. H. JANSEN, J. M. BURNS, W. HALLWACHS & P. D. N. EBERT. 2006. DNA barcoding distinguishes species of tropical Lepidoptera. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 103: 968-971.

HLEAP, J. S., A. F. NAVIA. & P. A. MEJÍA-FALLA. 2008. Patrones macroecológicos de los elasmobranchios marinos de Colombia. En: I Encuentro colombiano sobre conductos 2008. Bogotá, Colombia. 40 p

HLEAP, J.S., H. CÁRDENAS & F. GARCÍA-VALLEJO. 2009. preservación no criogénica de tejido y extracción de ADN: una aplicación para peces cartilaginosos. *PANAMJAS* 4(4): 283-293.

HLEAP, J.S. 2010. Heredabilidad y potencial evolutivos en *Urotrygon rogersi* (Chondrichthyes: Batoidea) de la costa centro-sur del pacífico colombiano. Tesis de maestría. Cali-Colombia. Universidad del Valle, Facultad de ciencias. 70p

HOELZEL, A.R. 2001. Shark fishing in fin soap. *Conservation Genetics* 2:69–72.

HOELZEL, A., SHIVJI, M., MAGNUSSEN, J. & FRANCIS P. 2006. Low worldwide genetic diversity in the basking shark (*Cetorhinus maximus*). *Biology letters* 2: 639–642.

HOLLAND, B. S. & HADFIELD, M. G. 2002. Islands within an island: phylogeography and conservation genetics of the endangered Hawaiian tree snail *Achatinella mustelina*. *Molecular Ecology* 11:365–376.

HOLMES, B., STEINKE D. & WARD R. 2009. Identification of shark and ray fins using DNA barcoding. *Fisheries research*. 95. 280–288

HORSTKOTTE, B. & H. REHBEIN. 2003. Fish species identification by means of restriction fragment polymorphism and high-performance liquid chromatography. *Journal of food science*. 68: 2658-2666.

IGLÉSIAS, S.P., LECOINTRE, G. & D.Y. SELLOS. 2005. Extensive paraphyly within sharks of the order Carcharhiniformes inferred from nuclear and mitochondrial genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 34: 569–583.

KEENEY, D., M. HEUPEL, R. HUETER & E. HEIST. 2005. Microsatellite and mitochondrial DNA analyses of the genetic structure of blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*) nurseries in the northwestern Atlantic, Gulf of Mexico, and Caribbean Sea. *Molecular Ecology* 14, 1911–1923.

KITAMURA, Y, A. TAKEMURA, S. WATABE, T. TANIUCHI & M. SHIMIZU. 1996. Molecular phylogeny of the sharks and rays of superorder Squalia based on mitochondrial cytochrome *b* gene. *Fish Science* 62:340–343

KNOWLTON, N. & L. A. WEIGT. 1998. New dates and new rates for divergence across the Isthmus of Panama. *Proc. R. Soc. Lond. B* 265, 2257–2263.

LEWALLEN, E.A., W. TODD & A.J. BOHONAK. 2007. Genetic structure of leopard shark (*Triakis semifasciata*) populations in California waters. *Marine Biology* 152:599–609.

LIBRADO, P. & J. ROZAS. 2009. DnaSP v5: a software comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451–1452.

LITTLE W. 1995. Common skate and tope: First Results of Glasgow Museum's tagging study. *Glasgow Naturalist* 22: 455–466.

LONGMIRE, J. L., M. MALTBIÉ, & R. J. BAKER. 1997. Use of “lysis buffer” in DNA isolation and its implications for museum collections. *Occasional Papers, The Museum of Texas Tech University*, 163: 1–3.

LÓPEZ, J.A., J.A. RYBURN, O. FEDRIGO & G.J.P. NAYLOR. 2006. Phylogeny of sharks of the family Triakidae (Carcharhiniformes) and its implication for the evolution of carcharhiniform placental viviparity. *Mol Phylogenet Evol* 40:50–60.

LYNCH, M. & P. E. JARRELL. 1993 A method for calibrating molecular clocks and its application to animal mitochondrial DNA. *Genetics* 135: 1197–1208.

MAISEY, J. G. 1984. Higher elasmobranch phylogeny and biostratigraphy. *Zoological Journal of the Linnean Society*. 82:33-54.

MARKMANN, M. & D. TAUTZ, 2005. Reverse taxonomy: an approach towards determining the diversity of meiobenthic organisms based on ribosomal RNA signature sequences. *Phil. Trans. R. Soc. B* 360: 1917-1924.

MARMI, J., R. AVELLANRDA & J. JORDANA. 2007. Análisis de la variabilidad de la región control mitocondrial en la raza ovina xisqueta. *Archivos de zootecnia*. 56(1): 429-434.

MARTIN, A. & PALUMBI S. 1993. Protein evolution in different cellular environments: cytochrome b in sharks and mammals. *Molecular biology evolution* 10(40): 873-891.

MCEACHRAN, J.D.1995. Urolophidae: Rayas redondas. En: Fischer, W., Krupp, F. Schneider, W., Sommer, C., Carpernter, K.E. & V.H. Niem. Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca. Pacífico Centro-Oriental. Volumen II. Vertebrados, Parte 1. Roma, FAO.

MEJÍA-FALLA, P., A.NAVIA, L.MEJÍA-LADINO, A. ACERO & E. RUBIO. 2007. Tiburones y rayas de Colombia (pisces elasmobranchii): lista actualizada, revisada y comentada. *Investigaciones Marinas* 36 : 7-46.

MEJIA-FALLA, P. & A. NAVIA. 2008a. Análisis estructural del ensamblaje bentónico-demersal de elasmobranquios en la zona centro sur del pacífico colombiano. En: *Memorias del I Encuentro colombiano sobre condricios*. Bogotá, Colombia.55 p

MEJIA-FALLA, P. & A. NAVIA. 2008b. Aspectos reproductivos y de crecimiento de la raya *Urotrygon aspidura* en el Pacífico vallecaucano, Colombia. En: Payán, L.F., Muñoz-Osorio, L.A., Ramirez-Luna, V. & L.M. Mejía-Ladino. Libro de resúmenes I Encuentro colombiano sobre condricios. Fundación SQUALUS, Cali. Pp. 45.

MEJIA-FALLA, P. & A. NAVIA. 2009. New records of *Urobatis tumbesensis* (Chirichigno & McEachran, 1979) in the Tropical Eastern Pacific. Pan-American Journal of Aquatic Sciences 4(3): 255-258.

MOLBO, D., MACHADO, C.A., SEVENSTER, J.G., KELLER, L. & E.A. HERRE. 2003. Cryptic species of fig-pollinating wasps: Implications for the evolution of the fig-wasp mutualism, sex allocation, and precision of adaptation. PNAS 100: 5867-5872.

MORITZ, C. & C. CICERO. 2004. DNA barcoding: promise and pitfalls. PloS. Biol. 2: 1529-1531.

MURRAY, B.W., J.Y. WANG, S. YANG, J.D. STEVENS, A. FISK & J. SVAVARSSON. 2008. Mitochondrial cytochrome b variation in sleeper sharks (Squaliformes: Somniosidae). Marine Biology 153: 1015–1022.

NAVIA, A. F. 2002. Aspectos de la biología de los elasmobranchios capturados como fauna acompañante del camarón en aguas someras del Pacífico colombiano. Tesis de pregrado. Universidad del Valle. Cali

NAVIA, A. F. 2009. Hábitos alimentarios, relaciones tróficas y función ecológica de *Urotrygon rogersi* (Elasmobranchii: batoida) de la zona central del océano Pacífico colombiano. Tesis de Maestría en Ciencias Biología, Facultad de Ciencias, Universidad del Valle, Cali

PALUMBI, S. 1996. Nucleic acids II: The polymerase chain reaction. In: Hillis, D.M., Moritz, C. & B.K. Mable (eds) Molecular systematics. Sinauer Assoc, Inc., Sunderland, pp 205–247.

PARDINI, A., C. JONES, L. NOBLE, B. KREISER, A. MALCOLM, B. BRUCE, J. STEVEN, G. CLIFF, M. SCHOLL, M. FRANCIS, C. DUFFY & A. MARTIN. 2001 Sex-biased dispersal of great white sharks. Nature 412: 139–140.

PAYAN, L. F., A. F. NAVIA, P. A. MEJÍA-FALLA, V. RAMÍREZ, L. S. GÓMEZ Y A. TOBON. 2008. Caracterización y comportamiento histórico de la pesca de elasmobranchios en el Pacífico colombiano. En: Memorias del I Encuentro colombiano sobre condriktios. Bogotá, Colombia. 32 p.

PEREGRINO, A., A. PACHECO & G. YEPIS. 2007. Diferencias en los genes 16sRRNA y citocromo oxidasa subunidad I en las lisas *Mugil cephalus* y *Mugil curema* y los robalos *Centropomus viridis* y *Centropomus robalito*. Ciencias marinas 33 (1):95-104.

PÉREZ, L., C. INFANTE & M. MANCHADO. 2005. Región de control mitocondrial de *Diplodus sargus* (Linnaeus, 1758), *Diplodus vulgaris* (Saint-Hilaire, 1817), *Diplodus bellottii* (Steindachner, 1882) y *Diplodus annularis* (Linnaeus, 1758): elementos reguladores y heteroplasma. Boletín Instituto Español Oceanografía. 21 (1-4): 247-252.

PINEDA, F.H.1990. El recurso camaronero de aguas someras de la costa pacífica vallecaucana según sus estadísticas de producción y esfuerzo de la empresa armadores pesqueros colombianos (ARPECOL) para el periodo 1980-1985. Revista de ciencia universidad del valle. 2:107-116.

PERALTA A. & J. PIQUERAS. 2002. Genética. 5ª. ed. Madrid. Ariel.474 p.

PUNTES, V., N MADRID & L.A. ZAPATA. 2007. Catch composition of the deep see shrimp fishery (*Solenocera agassizi* Faxon, 1893; *Farfantepenaeus californiensis* Holmes, 1990 and *Farfantepenaeus brevisrostris* Kingsley, 1878) in the Colombian Pacific Ocean. Gayana, 71 (1):84-95.

PTAK, S.E. & M. PRZEWORSKI. 2002. Evidence for population growth in humans is confounded by fine-scale population structure. Trends in Genetics 18: 559-563.

QUATTRO, J., D. STONER, W. DRIGGERS, C. ANDRESON, K. PRIEDE, N. HOPPMAN, M. DUNCAN & J. GRADY. 2006. Genetic evidence of cryptic speciation within hammerhead sharks (Genus *Sphyrna*). Marine Biology 148 : 1143-1155.

RAM, J., RAM, J. & BAIDOUN F. 1996. Authentication of canned tuna and bonito by sequence and restriction site analysis of polymerase chain reaction product of mitochondrial DNA. Journal of agriculture food chemistry. 44: 2460-2467.

RAMÍREZ-MACÍAS, D., R. VÁZQUEZ-JUÁREZ, F. GALVÁN-MAGAÑA & A. MUNGUÍA-VEGA. 2007. Variations of the mitochondrial control region sequence B. in whale sharks (*Rhincodon typus*) from the Gulf of California, Mexico 84(1): 87-95.

RANDI, E. 2000. Mitochondrial DNA. En: Baker, A.J. (Ed.). *Molecular Methods in Ecology*. Blackwell, Oxford, UK.

RUBINOFF, D. 2006. Utility of Mitochondrial DNA Barcodes in Species Conservation. *Conservation Biology* 20(4) 1026–1033.

RUBINOFF, D. & F. A. H. SPERLING. 2004. Mitochondrial DNA sequence, morphology and ecology yield contrasting conservation implications for two threatened Buckmoths (*Hemileuca: Saturniidae*). *Biological Conservation* 118:341–351.

RUIZ, M., E. RANDI, M. MARTÍNEZ & D. ALVAREZ. 2007. Relaciones filogenéticas entre géneros de ciervos neotropicales (*Artiodactyla: Cervidae*) mediante secuenciación de ADN mitocondrial y marcadores microsatelitales. *Revista de biología tropical*. 55 (2): 723-741.

SACCONE C., M. ATTIMONELLI & E. SBISA. 1987. Structural elements highly preserved during the evolution of the D-loop containing region in vertebrate mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.* 26:205-211.

SAMBROOK, J., E. F. FRITSCH & T. MANIATIS 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (2^a Ed.). Cold Spring Harbour Laboratory, NY, USA.

SALINAS HERNÁNDEZ, H. 2010. Identificación de haplotipos de *Spodoptera frugiperda* en algunas poblaciones de Colombia para el estudio del comportamiento migratorio de la especie. Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Colombia. 129p.

SANTOS. 2001. Identification of flatfish (*Pleuronectiformes*) species using DNA-based techniques. *Journal of agriculture food chemistry*. 49: 4562-4569.

SAUNDERS, G. W. 2005. Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future applications. *Phil. Trans. R.Soc. B* 360: 1879-1888.

SEZAK, I K., R.A. BEGUM, P. WONGRAT, M.P. SRIVASTAVA, S.SRIKANTHA, K.KIKUCHI, H. ISHIHARA, T. TANIUCHI & S.WATABE 1999. Molecular phylogeny of Asian freshwater and marine stingrays based on the DNA nucleotide and deduced amino acid sequences of the cytochrome b gene. *Fish Science* 65:563–570

SCHINDEL D. & S. MILLER. 2005. DNA barcoding a useful tool for taxonomists. *Nature*.435: 17.

SCHREY, A. & E. J. HEIST. 2003. Microsatellite Analysis of Population Structure in the Shortfin Mako (*Isurus oxyrinchus*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 60:670-675.

SHANGANG, J., C. HONG, Z. GUIXIANG, W. ZHIGANG, L. CHUZHAO, Y. RU & H. XU. 2006. Genetic variation of mitochondrial D-loop region and evolution analysis in some Chinese cattle breeds. *Journal of genetics and genomics*. 34(6): 510-518.

SMITH D., FALOPOLI M., TAYLOR B., GARNERY L., CORNUET J., SOLIGNAC M. & BROWN. 1991. Geographical overlap of two mitochondrial genomes in Spanish honeybee (*Apis mellifera iberica*) *Journal of heredity*. 82:96-100.

SOTELO, C., P. CALO-MATA, M. CHAPELA, R. PEREZ, H. REHBEIN, G. HOLD, V. RUSELL, S. PRYDE, J. QUINTERO, M. IZQUIERDO, M. MENDEZ, C. ROSA & A. STEPIEN, A. & T. KOCHER. 1997. Molecules and morphology in studies of fish evolution. *Molecular Systematics of Fishes*: 314 1-11.

SPIES I., GAICHAS S., STEVENSON D., O'RR W. & CANINO M.*2006. DNA-based identification of Alaska skates (*Amblyraja*, *Bathyrja* & *Raja*: Rajidae) using cytochrome c oxidase subunit I (coI) variation. *Journal of Fish Biology*. 69, 283–292.

SPRINGER, M.S., DEBRY, R.W., DOUADY, C., AMRINE, H.M., MADSEN, O., DE JONG, W.W. & M.J. STANHOPE. 2001. Mitochondrial versus nuclear gene sequences in deep-level mammalian phylogeny reconstruction. *Mol. Biol. Evol.* 18(2): 132-43.

TEMPLEMAN, W. 1984. Migrations of thorny skate, *Raja radiata*, tagged in the Newfoundland area. *J. Northw. Atl. Fish. Sci.*, 5: 55–63.

THOMPSON, J.D., D.G. HIGGINS, & T.J. GIBSON. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignments through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* 22:4673-4680.

VALSECCHI E., VACCHI M. & DI SCIARA G. 2005. Characterization of a New Molecular Marker for investigating Skate Population Genetics: Analysis of Three Mediterranean Skate Species (genus *Raja*) of Commercial Interest as a Test Case. *Journal of Northw. Atl. Fish. Sci.*, 35: 225–231.

VANBRABANT, J., B. GODDERRIS, K. MARTENS & I. SCHÖN. 2009. Development of primers for amplification and further research on D-loop control region for common spadefoot toad *Pelobates fuscus* (Amphibia). *Conservation genetics resources*. 1(1): 495-499.

VENCES, M., M. THOMAS, R. M. BONETT & D. R. VIEITES. 2005. Deciphering amphibian diversity through DNA barcoding: chances and challenges. *Phil. Trans. R. Soc. B* 360: 1859- 1868.

WARD R., ZEMLAK T., INNES B., LAST P., & HERBERT P. 2005. DNA barcoding australia's fish species. *Philosophical transactions of the royal society B-biological science*. 360: 1847-1857.

WARD R. & HOLMES B. 2007. An analysis of nucleotide and amino acid variability in the barcode region of Cytochrome c oxidase (cox1) in fishes. *Molecular. Ecology*. 7, 899–907.

WARD R., HOLMES B., WHITE T. & LAST R. 2008. DNA barcoding Australasian chondrichthyans: results and possible uses in conservation. *Mar. Freshwater Res.* 59, 57–71.

WINCHELL, C., A. MARTIN & J. MALLATT. 2004. Phylogeny of elasmobranchs based on LSU and SSU ribosomal RNA genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 31: 214–224.

ZARRATE, D.A. 2008. Análisis histórico sobre fauna acompañante de la pesca de arrastre de camarón de aguas someras (FACAS) en el pacífico colombiano. Tesis pregrado. Universidad Jorge Tadeo lozano. Bogotá. 98p.

